

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky
a komunikačních technologií

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA ELEKTROTECHNIKY
A KOMUNIKAČNÍCH TECHNOLOGIÍ**

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

**METODY HLUBOKÉHO UČENÍ PRO SEGMENTACI
NÁDOROVÝCH BUNĚK**

DEEP-LEARNING METHODS FOR TUMOR CELL SEGMENTATION

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Michal Špaček

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

MUDr. Jaromír Gumulec, Ph.D.

BRNO 2021

Bakalářská práce

bakalářský studijní program **Biomedicínská technika a bioinformatika**

Ústav biomedicínského inženýrství

Student: Michal Špaček

ID: 211690

Ročník: 3

Akademický rok: 2020/21

NÁZEV TÉMATU:

Metody hlubokého učení pro segmentaci nádorových buněk

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Prostřednictvím odborné literatury se seznámte s metodami pro segmentace pomocí konvolučních neuronových sítí a hlubokého učení. 2) Provedte literární rešerši se zaměřením na vhodné metody pro oddělení jednotlivých buněk při segmentaci. 3) Na základě literární rešerše vyberte nejvhodnější metodu/metody pro segmentaci buněk a ve zvoleném programovacím prostředí je realizujte. 4) Vytvořte (změňte a označte) dostatečně velký dataset buněk pro segmentaci. 5) Úspěšnost otestujte na dostupných datech a statisticky vyhodnoťte. 6) Provedte diskusi dosažených výsledků.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] RONNEBERGER, Olaf; FISCHER, Philipp; BROX, Thomas. U-net: Convolutional networks for biomedical image segmentation. In: International Conference on Medical image computing and computer-assisted intervention. Springer, Cham, 2015. p. 234-241.

[2] SCHMIDT, Uwe, Martin WEIGERT, Coleman BROADDUS a Gene MYERS. Cell Detection with Star-Convex Polygons. In: Medical Image Computing and Computer Assisted Intervention – MICCAI 2018. Cham: Springer International Publishing, 2018, 2018-09-26, s. 265-273. Lecture Notes in Computer Science. DOI: 10.1007/978--030-00934-2_30. ISBN 978-3-030-00933-5.

Termín zadání: 8.2.2021

Termín odevzdání: 28.5.2021

Vedoucí práce: MUDr. Jaromír Gumulec, Ph.D.

Konzultant: Ing. Tomáš Vičar

doc. Ing. Jana Kolářová, Ph.D.
předseda rady studijního programu

UPOZORNĚNÍ:

Autor bakalářské práce nesmí při vytváření bakalářské práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č.40/2009 Sb.

ABSTRAKT

Automatická segmentácia obrázkov, najmä mikroskopických obrázkov buniek, otvára nové príležitosti vo výskume rakoviny alebo v iných praktických aplikáciách. Nedávny pokrok v oblasti hlbokého učenia umožnil efektívnu segmentáciu buniek, automatická segmentácia sub-celulárnych oblastí je však stále náročná. Táto práca popisuje implementáciu neurónovej siete U-net na segmentáciu buniek a sub-celulárnych oblastí bez označenia na obrázkoch adherujúcich buniek rakoviny prostaty, konkrétne PC-3 a 22Rv1. Použitím prístupu s najlepším výkonom zo všetkých testovaných sa podarilo rozlíšiť medzi objektami a pozadím s priemernými Jaccard koeficientmi 0,71, 0,64 a 0,46 pre celé bunky, jadrá a jadierka. Ďalším bodom bola separácia jednotlivých objektov, teda buniek v obraze pomocou metódy povodia. Pri separovaní jednotlivých buniek sa podarilo dosiahnuť výsledky s hodnotou SEG 0,41 a podľa AP metriky 0,44.

KĽÚČOVÉ SLOVÁ

Segmentácia obrazu, hlboké učenie, konvolučná neurónová sieť, architektúra U-Net, kvantitatívne fázové snímanie, nádorové bunky

ABSTRACT

Automatic segmentation of images, especially microscopic images of cells, opens up new opportunities in cancer research or other practical applications. Recent advances in deep learning have enabled efficient cell segmentation, but automatic segmentation of subcellular regions is still challenging. This work describes the implementation of the U-net neural network for segmentation of cells and subcellular regions without labeling in the pictures of adhering prostate cancer cells, specifically PC-3 and 22Rv1. Using the best-performing approach of all tested, it was possible to distinguish between objects and background with average Jaccard coefficients of 0.71, 0.64 and 0.46 for whole cells, nuclei and nucleoli. Another point was the separation of individual objects, i. e. cells, in the image using the Watershed method. Separation of individual cells resulted in SEG value of 0.41 and AP metric of 0.44.

KEYWORDS

Image segmentation, deep learning, convolutional neural network, U-Net architecture, Quantitative phase imaging, tumor cells

ŠPAČEK, Michal. *Metody hlbokého učení pro segmentaci nádorových buněk*. Brno, 2021, 50 s. Bakalárska práca. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, Ústav biomedicínského inženýrství. Vedúci práce: MUDr. Jaromír Gumulec, Ph.D.

VYHLÁSENIE

Vyhlasujem, že svoju bakalársku prácu na tému „Metody hlubokého učení pro segmentaci nádorových buněk“ som vypracoval samostatne pod vedením vedúceho bakalárskej práce, s využitím odbornej literatúry a ďalších informačných zdrojov, ktoré sú všetky citované v práci a uvedené v zozname literatúry na konci práce.

Ako autor uvedenej bakalárskej práce ďalej vyhlasujem, že v súvislosti s vytvorením tejto bakalárskej práce som neporušil autorské práva tretích osôb, najmä som nezasiahol nedovoleným spôsobom do cudzích autorských práv osobnostných a/alebo majetkových a som si plne vedomý následkov porušenia ustanovenia § 11 a nasledujúcich autorského zákona Českej republiky č. 121/2000 Sb., o práve autorskom, o právach súvisiacich s právom autorským a o zmene niektorých zákonov (autorský zákon), v znení neskorších predpisov, vrátane možných trestnoprávných dôsledkov vyplývajúcich z ustanovenia časti druhej, hlavy VI. diel 4 Trestného zákonníka Českej republiky č. 40/2009 Sb.

Brno

.....

podpis autora

POĎAKOVANIE

Rád by som poďakoval vedúcemu bakalárskej práce MUDr. Jaromírovi Gumulcovi, Ph.D, rovnako tak konzultantovi Ing. Tomášovi Vičarovi za odborné vedenie, konzultácie, trpezlivosť a podnetné návrhy k práci.

Obsah

Úvod	8
1 Analýza buniek v biologických experimentoch	9
2 Neurónové siete	12
2.1 Neurón	12
2.2 Viacvrstvová neurónová sieť	13
2.3 Učenie neurónových sietí	13
2.4 Transfer learning	14
2.5 Kriteiálne funkcie	15
2.6 Optimalizačné algoritmy	16
2.7 Konvolučné neurónové siete	18
3 Segmentácia obrazových dát	23
3.1 Základné metódy segmentácie	23
3.2 Segmentácia obrazu	24
3.3 Architektúry CNN vhodné na segmentáciu	24
3.4 Dištančná transformácia	28
3.5 Metóda povodia	28
3.6 Hodnotiace metriky pre sémantickú segmentáciu	29
3.7 Hodnotiace metriky pre segmentáciu inštancií	29
4 Tvorba datasetu, návrh a implementácia	31
4.1 Dataset	31
4.2 Sémantická segmentácia	33
4.3 Segmentácia inštancií	34
5 Výsledky a diskusia	37
5.1 Výsledky dosiahnuté pri sémantickej segmentácii	37
5.2 Výsledky dosiahnuté pri segmentácii inštancií	40
Záver	44
Literatúra	45
A Obsah priložených súborov	50

Zoznam obrázkov

1.1	Schéma tomografického fázového mikroskopu	11
2.1	Biologický neurón	12
2.2	Matematický model neurónu	13
2.3	Schéma viacvrstvovej siete	14
2.4	Gradient a stochastický gradient	17
2.5	Princíp konvolučnej vrstvy	19
2.6	Prehľad aktivačných funkcií	20
2.7	Princíp max a mean pooling	20
2.8	Dropout vrstva	21
3.1	Rozdelenie typov segmentácie	25
3.2	Architektúra U-Net siete	26
3.3	Mask R-CNN sieť	27
3.4	Stardist	27
3.5	Dištančná transformácia	28
4.1	Príklady vybraných rezov z tomogramov refrakčného indexu	32
4.2	Schéma algoritmov	36
5.1	Porovnanie manuálnych masiek s predikčnými	40
5.2	Porovnanie manuálnych masiek s predikčnými prelínaním	41
5.3	Porovnanie sémantickej a instance segmentácie	42
5.4	Graf segmentačnej úspešnosti cez AP	43

Úvod

Táto práca sa venuje segmentácií nádorových buniek pomocou konvolučných sietí. Umelá inteligencia sa stáva stále viac a viac našou neoddeliteľnou súčasťou života. Je videná na mnohých miestach, od domácich spotrebičov, cez personalizované reklamy na obrazových zariadeniach až po autonómne jazdiace autá. Za posledné roky sa využitie umelej inteligencie exponenciálne zvýšilo, a tým aj jej fungovanie. Už dnes je možné vidieť, že je oveľa presnejšou v niektorých veciach ako človek.

V tejto práci sa rozpráva o určitej časti umelej inteligencie, a tým je segmentácia pomocou neurónových sietí. V práci je dôležité delenie a hlavne nadväznosť sémantickej segmentácie na segmentáciu inštancií, ich jednotlivé a odlišné metódy a rozdielne výstupy, kde výsledky zo segmentácie inštancií sú závislé na sémantických. Objektom segmentovania je morfológicky heterogénna zmes buniek prostaty nasnímaných bez prítomnosti fluorescenčných farbív pomocou kvantitatívne fázovej mikroskopie, tzv. optickou difrakčnou tomografiou. Segmentácia je jedna z dôležitých častí neurónových sietí, ktorá sa stará hlavne o analýzu dát na pixelovej úrovni.

V prvej časti sa opisujú význam a funkcie biologického neurónu a jeho implementácie do neurónových sietí. Na to sa popisujú neurónové siete, ich vlastnosti, typy, spôsoby učenia, jednotlivé vrstvy, optimalizačné algoritmy a kritériálne funkcie. Ďalšia časť diskutuje metódy segmentácie obrazu, rozdelenie na sémantickú a inštančnú segmentáciu, jednotlivé architektúry sietí vhodných na segmentáciu, metód na získanie dištančných máp, metódu povodia na separáciu buniek a hodnotiace metriky na evaluáciu. Potom bola prebraná tvorba datasetu a spôsob kultivácie buniek a ich vlastnosti. V ďalšom bode bola opísaná manuálna anotácia buniek, ich predpracovanie a augmentácia. Nasledovala implementácia sémantických a inštančných metód vysvetlených v teoretickom úvode, ukázali sa rozdiely medzi jednotlivými implementáciami a ich výstupmi. V poslednom kroku sa vyhodnocovali úspešnosti použitých segmentačných metód a natrénovaných modelov, kde sa potom diskutovali výsledky a porovnávali s inými štúdiami.

Na spracovaní mikroskopických obrazov sme spolu s kolegom z ročníka Jakubom Majerčíkom spolupracovali na Ústave patologickej fyziológie Lekárskej fakulty Masarykovej univerzity.

1 Analýza buniek v biologických experimentoch

Mikroskopické metódy sú bezpochyby spojené s biologickými experimentami a medicínskou diagnostikou, uplatňujú sa pri určení diagnózy, testovaní liečiv pre výskumné účely, či vo štúdiu fyziologických bunecných procesoch. Obrazová analýza mikroskopických dát umožňuje robustné metódy extrakcie biologicky relevantných parametrov z mikroskopických dát. Neoddeliteľnou súčasťou týchto analýz je obrazová segmentácia ako aj celých buniek, tak aj jej sub-celulárnych súčastí.

V tejto práci sa pracuje s nádorovými bunkami prostaty. Rakovina prostaty je druhou najčastejšou diagnostikovanou rakovinou a šiestou najčastejšou príčinou úmrtia na rakovinu u mužov 14% (903 500) z celkového počtu nových prípadov rakoviny a 6% (258 400) z celkového počtu úmrtia na rakovinu u mužov v roku 2008 [1]. Prevalencia rakoviny prostaty stúpa s vekom [2]. Rakovina prostaty je teda ochorenie, ktoré postihuje predovšetkým starších mužov. Zvyčajne však nádory reagujú na liečbu a ak sú lokalizované, môžu byť vyliečiteľné. Rýchlosť rastu nádorov sa líši, od veľmi pomalej až po stredne rýchlu. Miera prežitia niektorých pacientov môže byť predĺžená, a to aj napriek metastázam do vzdialených oblastí.

Pokiaľ ide o analýzu nádorových buniek, zmeny v štruktúre jadra sa všeobecne považujú za diagnosticky významné. Patrí sem zväčšená veľkosť jadriek, rovnako to má tiež vplyv aj na bunecné delenie, deformácia tvaru jadra a zmeny v organizácii jadra, pokiaľ sú pozorované svetelnou mikroskopiou [3] [4] [5]. Presná lokalizácia a segmentácia bunkového jadra sú rozhodujúce pre pochopenie fyziológie bunky v biológii bunky a diagnostiku malígnych nádorov. Okrem svojej primárnej funkcie ako nosič genetickej informácie, vlastnosti bunkových jadriek majú v medicíne rôzne úlohy, od diagnostiky až po terapiu. Napríklad pomer objemu jadra k cytoplazme môže indikovať malignitu buniek. [6]

Aj keď celková diagnostika rakoviny prostaty je založená na kombinácii faktorov, prítomnosť prominentných jadriek je považovaná ako jeden z najvplyvnejších faktorov. V štúdií Varma et al. [7] uviedli, že vyčnievajúce jadierka boli pozorované u 94% druhov rakoviny diagnostikovaných na rutinnom biotickom materiáli. Epstein [8] však pozoroval iba 76% prípadov s výraznými jadierkami v materiáli na biopsiu ihlou. [9] [6]

Fluorescenčná mikroskopia

Ťažiskom morfológických experimentov je fluorescenčná mikroskopia. Je to efektívna forma mikroskopie hlavne pri pozorovaní biologických vzoriek. Využíva fluorofory navrhnuté k tomu, aby infiltrovali biologickú vzorku a naviazali sa na jeho konkrétnu

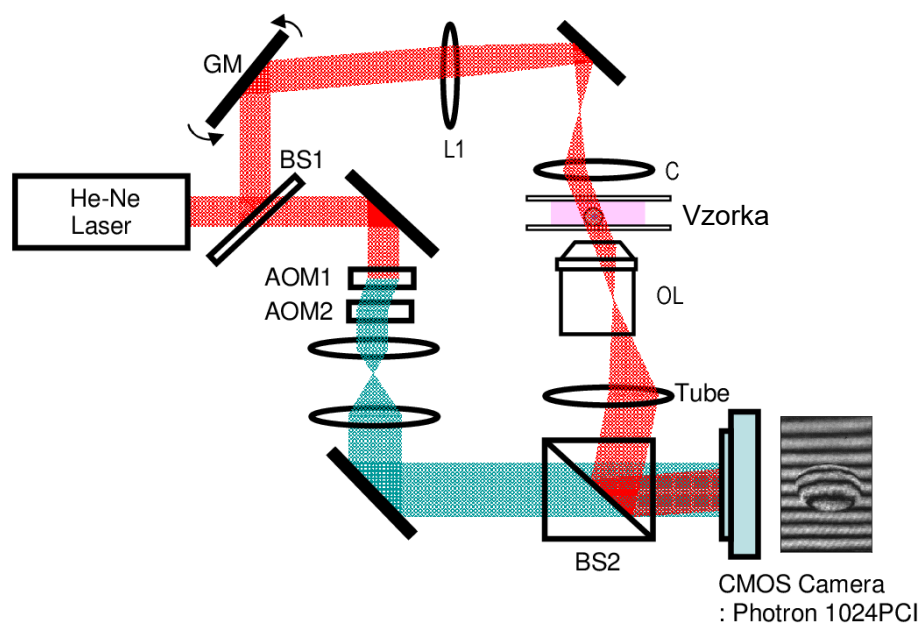
časť, ktorú chcem pozorovať. Vzorka je osvietená svetlom o takých vlnových dĺžkach, aby sa spektrálne zloženie excitačného zväzku čo najviac krylo s absorpčným spektrom fluoroforu. Fluorofor naviazaný na konkrétnu časť vzorky emituje fotóny tvoriace emisné spektrum. Emisné spektrum je posunuté oproti absorpčnému smerom k ďalším vlnovým dĺžkam. Dôležitou súčasťou sú filtry, ktoré umožňujú oddelenie relatívne slabého emisného svetla od silného excitačného. Dostatočný Stokesov posun je nutný pre možnosť efektívneho oddelenia oboch druhov žiarenia. Pomocou emisného svetla je možné vytvoriť veľmi kontrastný snímok zobrazujúci konkrétnu časť vzorky (napríklad bunkové jadro), na ktorú je naviazaný fluorofor. Nevýhodou fluorescenčnej mikroskopie je, že samotné bunky, ktoré sú predmetom pozorovania, môžu byť poškodené procesom fluorescenčnej mikroskopie, a to z hľadiska vystavenia svetlu, ako aj samotných fluoroforov. Nižšie vlnové dĺžky svetla používané na excitáciu fluoroforu sú obzvlášť škodlivé pre bunky, jednak priamo poškodzujú DNA a inak produkujú reaktívne formy kyslíka, ktoré ďalej ovplyvňujú životaschopnosť buniek. V mnohých prípadoch to nie je ale problém, pretože požadované informácie ide zhromaždiť dostatočne rýchlo, kým dôjde k poškodeniu buniek. Avšak v štúdiách s časovým priebehom, ktoré závisia od opakovaného vyšetrenia tých istých buniek, kumulatívny efekt môže byť značný, nie len ovplyvňujúci životaschopnosť buniek, ale spôsobujúci zvýšenú permeabilitu bunkovej membrány a degradáciu cytoskeletu, čo môže potenciálne negatívne ovplyvniť zhromaždené údaje. [10]

Optická difrakčná tomografia

Práve túto nevýhodu napravuje Optická difrakčná tomografia (ODT), ktorá nevyžaduje použitie exogénnych označovacích činidiel alebo farbív, ako sú napríklad fluorescenčný proteín, či farbivá naviazané na protilátky a kvantové bodky. V ODT sa ako zobrazovací kontrast používa refrakčný index (RI), vnútorný optický parameter materiálu. ODT eliminuje komplikované procesy prípravy vzoriek a prekonáva obmedzenia označovacích látok alebo farbív, ako je napríklad photobleaching, čo je slabnutie obrazu po žiarení, alebo fototoxická. Optická difrakčná tomografia je jednou z techník 3D QPI (kvantitatívne fázové snímanie), ktorá rekonštruje distribúciu 3D indexu lomu (RI) vzorky z viacerých 2D holografických obrazov meraných pri rôznych uhloch osvetlenia. Vďaka svojej schopnosti kvantitatívneho zobrazovania bez označenia sa ODT využíva v rôznych formách štúdia vrátane hematológie, infekcie a štúdia kvasiniek. Okrem toho je RI vnútorná vlastnosť materiálov radiacií interakciu ľahkej hmoty, tzv. rozptylový potenciál, a rekonštruovaný tomoogram poskytuje bohaté morfológické informácie o bunkách. Avšak RI rozsahy sa prekrývajú medzi rozdielnymi bunkovými komponenty, ako napríklad sub-celulárne organely (jadro, jadierko) alebo signalizujúce proteíny, bránia zobrazovaniu vysokej

špecifičnosti. Čiže určenie hranice určitých sub-celulárnych organel je problém. Výslednými charakteristikami merania sú hrúbka a refrakčný index (RI). [6]

Index lomu buniek je kľúčovým biofyzikálnym parametrom, ktorý bol rozsiahlo študovaný. Koreluje s inými biofyzikálnymi vlastnosťami bunky vrátane mechanických, elektrických a optických vlastností a predstavuje nielen intracelulárnu hmotu a koncentráciu bunky, ale poskytuje aj dôležitý pohľad na rôzne biologické modely. [11] Stavba tomografického fázového mikroskopu na 1.1.



Obr. 1.1: GM - galvanické skenovacie zrkadlo, L1 - šošovka, C - kondenzátorová šošovka, OL - objektív, Tube - tubus, BS1 a BS2 - polopriepustné sklíčka, AOMs - akusticko-optické moderátory, prebraté z [12]

2 Neurónové siete

Neurónové siete, ako séria algoritmov, sa snažia rozpoznať základné vzťahy v množine údajov prostredníctvom procesu, ktorý napodobňuje spôsob fungovania ľudského mozgu. Neurónové siete sa môžu prispôbiť meniacemu sa vstupu, tým sieť generuje najlepší možný výsledok bez potreby zmeny výstupných kritérií.

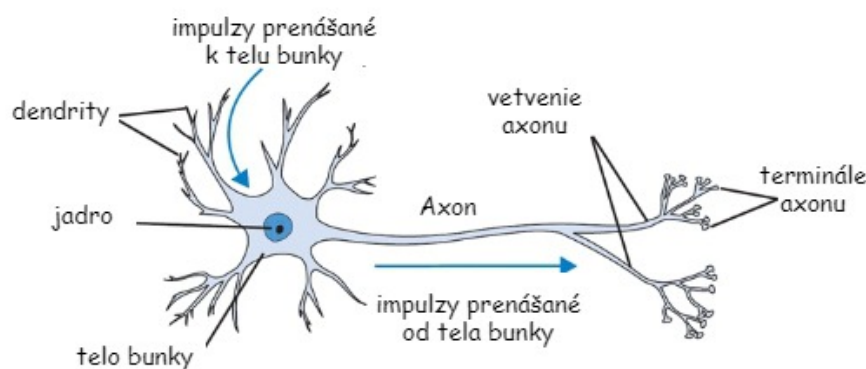
2.1 Neurón

Biologický neurón je funkčná a anatomická jednotka nervového systému, táto bunka je špecializovaná do takej miery, že dokáže prijať určité formy signálov, odpovedať špeciálnymi signálmi, viesť a vytvárať špecifické funkčné kontakty tzv. synapsie s ostatnými neurónmi, receptormi. Stavba a prenos vzruchu neurónu na 2.1. Podstatnou časťou každého neurónu je telo bunky, ohraničené plazmatickou membránou, štruktúrou podmieňujúcu vznik a šírenie akčného vzruchu.

Ďalšou dôležitou časťou neurónovej bunky sú výbežky, ktoré môžeme rozdeliť na dendrity, výbežky prijímajúce vstupnú informáciu a axon, dlhý výbežok šíriaci akčný vzruch v smere od neurónu.

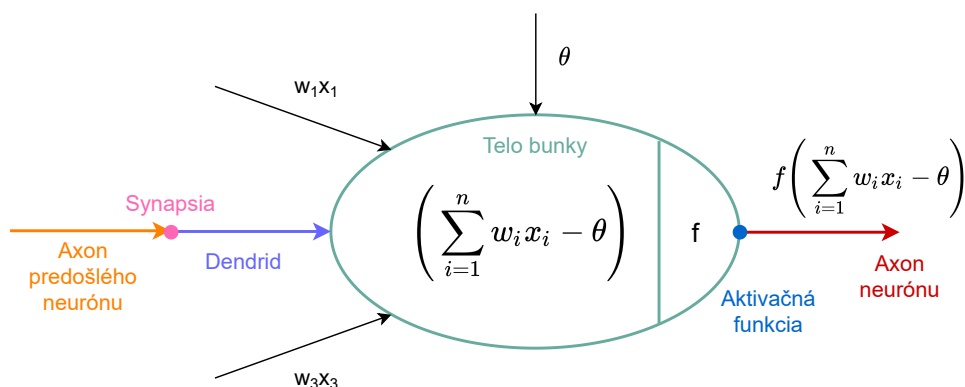
Ďalšou dôležitou časťou neurónovej bunky sú výbežky, ktoré môžeme rozdeliť na dendrity a axon. Dendrity sú výbežky prijímajúce vstupnú informáciu a axon je dlhý výbežok šíriaci akčný vzruch v smere od neurónu.

[13] [14]



Obr. 2.1: Biologický neurón, upravené z: [13]

Na podobnom princípe funkčnosti biologického neurónu funguje aj matematický model neurónu, zobrazený na 2.2. Informácie, ktoré sa dostávajú do biologického neurónu cez dendrity, sa v matematickom modeli zobrazujú ako vstupné hodnoty x_0, x_1, \dots, x_n . Vákovanie vstupných hodnôt prebieha cez náhodný vektor veličín w_0, w_1, \dots, w_n , čo sa dá prirovnať v biologickom neuróne ako významnosť určitej synapsie,



Obr. 2.2: Matematický model neurónu, inšpirované z: [13]

teda ako sila spojitosti medzi neurónom vedúci vzruch a neurónom prijímajúci ho. Od súčtu všetkých váhovaných vstupov sa odráta prah, nakoniec celý súčet nazývaný aktivátor vstupuje ako argument do aktivačnej funkcie f , ktorá rozhoduje, či sa bude alebo nebude daný neurón aktivovať. [15]

Matematický model neurónu môžeme zapísať vo vzťahu:

$$y = f\left(\sum_{i=1}^n w_i x_i - \theta\right), \quad (2.1)$$

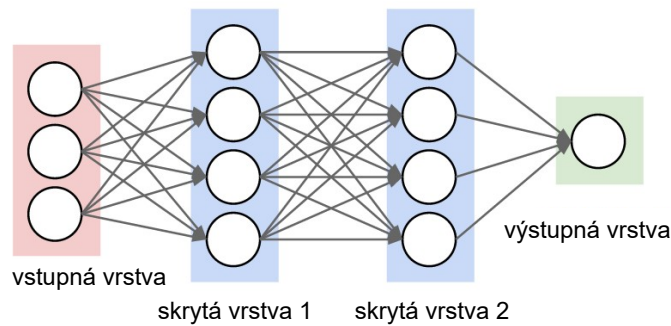
kde x_i je vstupný vektor neurónu a w_i je vektor obsahujúci jeho váhy, θ je prah a f je aktivačná funkcia.

2.2 Viacvrstvá neurónová sieť

V jednovrstvovej sieti sa nachádza vstupná vrstva a výstupná vrstva, rozdiel v jednovrstvovej a viacvrstvovej sieti je prítomnosť ďalšej jednej alebo viacerých skrytých vrstiev. Počet skrytých vrstiev a ich veľkosť, teda počet neurónov na jednej vrstve, závisí od typu problému. Pre plne prepojené siete, ktoré sú najpoužívannejšie, platí, že každý neurón z jednej vrstvy je prepojený s každým neurónom ďalšej vrstvy. Z teoretického hľadiska by na vyriešenie problému stačili 2 skryté vrstvy, no v praktickom hľadisku sa používajú aj vo väčšom množstve. Všeobecne platí, čím viac vrstiev sieť má, tým komplikovanejšie úlohy je schopná riešiť. Schéma viacvrstvovej siete na 2.3.

2.3 Učenie neurónových sietí

Učenie neurónových sietí môžeme robiť tromi spôsobmi, učením s učiteľom, učením bez učiteľa a reinforcement learning.



Obr. 2.3: Schéma 3 vrstvovej siete, prevzaté z: [13]

Učenie s učiteľom je metóda, kde máme k dispozícii okrem vstupných dát aj ich odpovedajúce výstupy, tzv. anotácie. Neurónová sieť v priebehu učenia spracováva vstupné dáta a následne porovná jej výstup s odpovedajúcim anotáciou. Pokiaľ sa líšia, spočíta sa stratová funkcia a ďalej sa podľa nej upraví váhy.

Učenie bez učiteľa prebieha bez anotácií. Hodnoty váh sa nastavujú iba podľa vstupných dát. Sieť sa snaží nájsť podobnosti medzi vstupmi, ktoré následne zhlukuje.

V reinforcement learning ide o typ algoritmu, ktorý sa učí pomocou metódy pokus omyl pri interakcii s dynamickým prostredím.

2.4 Transfer learning

Transfer je populárna metóda v počítačovom videní, pretože umožňuje vytvárať presné modely v krátkom čase. S prenosovým učením, miesto začínania učiaceho procesu od začiatku, tzv. from scratch, sa vychádza s parametrov, ktoré sa naučili pri riešení iných problémov. Týmto spôsobom sa využívajú predchádzajúce poznatky a vyhne sa začínaniu od nuly. V počítačovom videní sa prenosové učenie zvyčajne vyjadruje pomocou vopred pripravených modelov. Predtrénovaný model je model, ktorý bol trénovaný na veľkej referenčnej množine údajov, aby vyriešil problém podobný tomu, na ktorý sa potom neskôr použije. Z dôvodu výpočtových nákladov na učenie takýchto modelov je bežnou praxou importovať a používať modely z publikovanej literatúry, príkladom predučené modely na ImageNet [16], čo je databáza obrázkov usporiadaná podľa hierarchie WordNet (v súčasnosti iba podstatné mená), v ktorej je každý uzol hierarchie zobrazený stovkami a tisíckami obrázkov. Tento projekt prispel k zlepšeniu počítačového videnia a výskumu hlbokého učenia. Údaje sú výskumníkom k dispozícii zadarmo na nekomerčné použitie. [17]

2.5 Kriteriaálne funkcie

Stredná kvadratická chyba

Stredná kvadratická chyba, anglicky mean squared error (MSE) je jednou z najbežnejšou stratovou funkciou. MSE je rátaný ako rozdiel medzi referenciou, teda očakávaným výstupom a výstupom, umocnený na druhú a spriemerovaním v celom súbore dát. [18] Vzorec pre MSE:

$$MSE = \frac{1}{N} \sum (y_i - \gamma_i)^2, \quad (2.2)$$

kde N je počet vzoriek, y_i je referenčná hodnota a γ_i predikovaný výstup. Medzi výhody MSE patrí fakt, že nemá žiadne lokálne minimá a penalizuje model zväčšovaním chyby násobením na druhú. Nevýhodou je, že nepracuje správne s odľahlými hodnotami. Pretože odľahlá hodnota bude veľká chyba, penalizuje to model umocňovaním na druhú.

Stredná absolútna chyba

Stredná absolútna chyba, v angličtine mean absolute error (MAE) je súčet absolútnych rozdielov medzi referenciou a výstupom. Výhodou je lepšie zvládanie odľahlých hodnôt ako MSE, lebo ich neumocňuje na druhú. Nevýhodou je vysoká výpočtová náročnosť, kvôli rátaní s absolútnymi hodnotami a možnosť výskytu lokálneho minima. [18]

Huber loss

Huber loss je kombinácia MSE a MAE. Strata je kvadratická (MSE), keď chyba je malá, inak funguje ako MAE. [18] Vzorec:

$$L_\delta(y, f(x)) = \begin{cases} \frac{1}{2}(y - f(x))^2 & \text{pre } |y - f(x)| \leq \delta, \\ \delta|y - f(x)| - \frac{1}{2}\delta^2 & \text{inak.} \end{cases} \quad (2.3)$$

Výhodami Huber loss sú zvládnutie odľahlých hodnôt správne a rovnako tak správne zvládnutie situácie s lokálnymi minimami. Nevýhodou sú zvýšené tréningové požiadavky, Aby sa maximalizovala presnosť modelu, bude tiež potrebné optimalizovať hyperparameter δ . [18]

Dice loss

Dice loss vychádza z Dice koeficientu (DSC), čo je bežne používaná metrika na hodnotenie kvality segmentácie vzhľadom na referenciu. Hodnotenie ide od 0 ku 1, kde smerom k nule sa segmentácie neprekrývajú vôbec a naopak smerom k 1 sa

prekrývajú viac a viac. Môžeme preto vypočítať hodnotu Dice loss ako $1 - DSC$. Vzorec pre výpočet Dice koeficientu:

$$DSC = \frac{2TP}{2TP + FP + FN}. \quad (2.4)$$

2.6 Optimalizačné algoritmy

Optimalizačné algoritmy alebo krátko optimalizátory sú metódy používané k zmene parametrov neurónovej siete ako sú váhy a rýchlosť učenia v dôsledku zníženia chybovej funkcie na minimum. Spôsob zmeny váh alebo rýchlostiach učenia závisí od typu optimalizačného algoritmu. [19]

Gradientný zostup

Gradientný zostup je najjednoduchší, no najviac používaný optimalizačný algoritmus, využívaný hlavne v lineárnej regresii a klasifikačných algoritmoch. Gradientný zostup sa označuje ako prvo radový z dôvodu závislosti na prvej derivácii stratovej funkcie. Počíta to cestu, ktorým by mali byť váhy upravované, aby stratová funkcia dosiahla minima. Úprava parametrov sa dá zapísať ako:

$$\theta = \theta - \eta \cdot \nabla J(\theta), \quad (2.5)$$

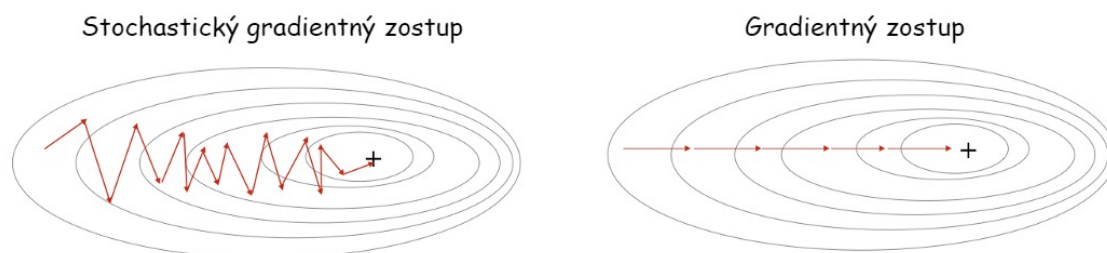
kde η je rýchlosť učenia a $\nabla J(\theta)$ je prvá derivácia stratovej funkcie. Medzi výhody tohto algoritmu patria ľahká implementácia a porozumenie danej metódy, kde k nevýhodám patria možnosť zachytenia sa na lokálnom minime nie globálnom a z dôvodu, že sa váhy menia až po vyrátaní gradientu na celkom datasete, môže spôsobiť požiadavok na veľkú pamäť a taktiež očakávať dlhšiu dobu konverencie, ak bude dataset príliš veľký. [19]

Stochastický gradientný zostup - SGD

Stochastický gradientný zostup je varianta gradientného zostupu. Algoritmus sa pokúša o úpravu parametrov častejšie ako gradientný zostup. Parametre sú upravované vypočítaním stratovej funkcie po každom vstupe. Čiže ak dataset obsahuje 1000 vstupných dát, SGM upraví parametre 1000krát, kde gradientný zostup by ich upravil iba raz.

$$\theta = \theta - \eta \cdot \nabla J(\theta; x^{(i)}; y^{(i)}), \quad (2.6)$$

kde $x^{(i)}$, $y^{(i)}$ sú vstupné dáta. Z dôvodu častého aktualizovania parametrov, majú parametre veľkú variabilitu a fluktuáciu stratových funkcií pri rôznej intenzite. Výhody spočívajú v kratšej konvergencii z dôvodu častejšieho upravovania dát a potreba menšej pamäte počítača, naopak aby sa dosiahla rovnaká konvergencia ako pri gradientom zostupe, musí rýchlosť učenia pomaly klesať, nech po dosiahnutí globálneho minima sa už nekonverguje mimo. Porovnanie oboch optimalizátorov na 2.4. [19] [20]



Obr. 2.4: Vľavo: SGD, Vpravo: GD, upravené z: [13]

Momentum

Momentum optimalizačný algoritmus bol vynájdený na zníženie veľkej variability v SGD a zjemnenie konvergenzie. Urýchľuje konvergenciu k relevantnému smeru a zmierňuje fluktuáciu do irelevantného. V tejto metóde sa používa navyše parameter momentum symbolizovaný ako γ . Úpravu parametru môžeme vidieť vo vzorci:

$$v_t = \gamma v_{t-1} + \eta \cdot \nabla J(\theta), \quad (2.7)$$

a následne úpravu váh:

$$\theta = \theta - v_t. \quad (2.8)$$

Hodnota γ sa nastavuje väčšinou na 0,9. Výhoda v tejto metóde je zníženie oscilácií a variability parametrov, taktiež konvergencia je rýchlejšia ako v gradientom zostupe. Ako nevýhoda je pridanie hyper-parametru γ a jeho manuálne nastavovanie. [20]

Adam

Adam alebo Adaptive Moment Estimation pracuje s momentami prvého a druhého rádu. Metóda Adam vznikla z nápadu, že miesto rýchleho hľadania minima, kde by mohlo dôjsť k jeho prejdenu, sa rýchlosť postupne znižuje pre starostlivé hľadanie

minima. Okrem ukladania exponenciálne klesajúceho priemeru predošlých štvorcových gradientov \hat{v}_t , Adam udržuje aj exponenciálne klesajúci priemer predošlých gradientov \hat{m}_t . Pre úpravu parametrov potom:

$$\theta_{t+1} = \theta_t - \frac{\eta}{\sqrt{\hat{v}_t} + \epsilon} \hat{m}_t. \quad (2.9)$$

Adam je jeden z najlepších optimalizačných algoritmov. Patrí k najviac používaným algoritmom čo sa týka v učenia neurónových sietí, kde dosahuje výborné výsledky. Výhody metódy Adam sú okrem vysokej rýchlosti konvergenzie a veľkej variability aj opravovanie miznúcej rýchlosti učenia. [19] [21]

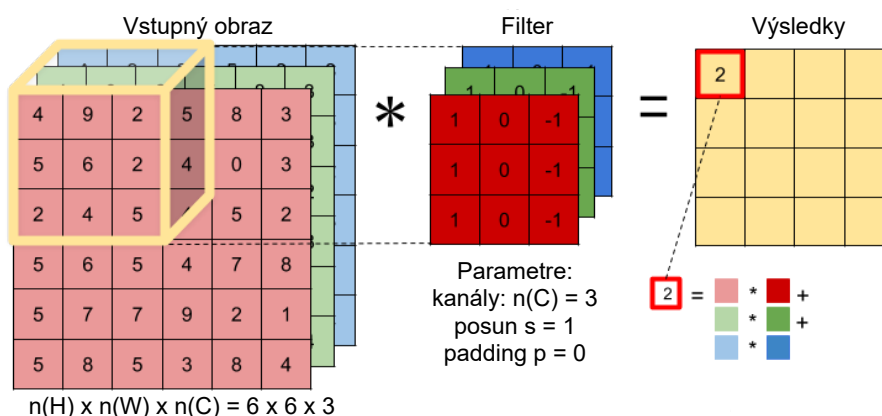
2.7 Konvolučné neurónové siete

Konvolučné neurónové siete, z angličtiny Convolutional neural network (CNN), ako trieda neurónových sietí, sa špecializuje v spracovaní dát s mriežkovou topológiou, čo je napríklad aj obrazové dáta. Kľúčovou operáciou týchto neurónových sietí je konvolúcia. Tým, že predpokladáme na vstupe obraz, jednotlivé neuróny sú usporiadané do 3 smerov, a tým sú šírka, výška a hĺbka. Rozdielom medzi bežnými neurónovými sieťami a konvolučnými je aj ten, že neuróny v jednotlivých vrstvách nie sú plno prepojené, ako to býva u bežných sieťach. V konvolučných neurónových sieťach sa v jednotlivých neurónových vrstvách budú pripájať iba určité oblasti vrstvy predošlej. [22]

Konvolučná vrstva

Konvolučná vrstva je základom konvolučných neurónových sietí. Hlavná pointa konvolučnej vrstvy je extrakcia jednotlivých príznakov z obrazu. Vrstva obsahuje niekoľko filtrov, ktoré postupne prechádzajú celé vstupné dáta a vykonávajú konvolúciu. Z dôvodu vysokej výpočtovej náročnosti, keďže obrazové dáta majú veľké rozmery, je nepraktické spájať každý neurón vstupnej vrstvy s každým neurónom konvolučnej vrstvy. Namiesto toho spájame iba určitý lokálny región obrazu, tzv. receptive field. Každé toto spojenie má určitú váhu a prah, ktoré ostávajú rovnaké aj pri každej polohe onoho filtru, teda váhy filtru sú zdieľané pre všetky pozície filtru, aby ním bolo možné získať určitý príznak. Kvôli tomu nie je potreba si pamätať toľko parametrov.

Výstupom konvolučnej vrstvy je príznaková mapa a je určená tromi hyperparametrami. Prvý je počet filtrov alebo hĺbka, kde každý z filtrov sa učí hľadať iné príznaky ako vertikálne či horizontálne hrany, alebo farebné zhluky. Druhým je veľkosť kroku posúvania filtru, čo určuje o koľko pixelov sa bude filter posúvať a nakoniec zero-padding, čo je pridávanie väčšinou núl okolo vstupnej matice, čím sa umožňuje



Obr. 2.5: Princíp konvolučnej vrstvy, upravené podľa: [13]

priama kontrola veľkosti výstupu, často sa totiž očakáva, aby výstup bol rovnako veľký ako vstup. Princíp konvolučnej vrstvy na 5.4 [23]

Aktivačné funkcie

Aktivačná funkcia je aplikovaná na výstupy z konvolučnej vrstvy rovnako ako pri klasických neurónových sieťach. Úlohou aktivačných funkcií je pridať do neurónovej siete nelinearitu. Typov aktivačných funkcií je mnoho, no v moderných neurónových sieťach sa prestávajú používať sigmoidálne funkcie alebo hyperbolických tangent, miesto nich sa prevažne využívajú funkcie ReLU a jej modifikácie, ukážka aktivačných funkcií 2.6. Výhody v tejto funkcií oproti ostatným sú hlavne v rýchlosti konvergencie k optimu, v jednoduchosti výpočtu a jej ľahkej diferenciácii. ReLU je veľmi ľahko interpretovateľná.

$$f(x) = \max(0, x) \quad (2.10)$$

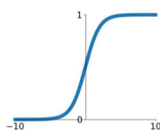
Pokiaľ je vstup menší alebo rovný 0, výstupom bude 0, naopak ak vstup je väčší ako 0, jej výstup bude rovný vstupu.

Pooling vrstva

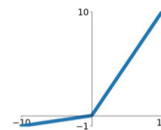
Pooling vrstva je typicky umiestňovaná za aktivačnú funkciu konvolučnej vrstvy. Výstup konvolučnej vrstvy je nahradený v určitom mieste za štatistický súhrn výstupov v jeho blízkom okolí v procese pooling. Týmto súhrnom môže byť napríklad maximum v obdĺžnikovom okne, priemer v obdĺžnikovom okne a iné. Princíp oboch metód na 2.7. Jedným výhodou využitia pooling vrstvy je zavedenie priestorov invariance proti malým posunom v jednotkách pixelu do modelu. Ďalšou výhodou je, že pokiaľ zavedie to operácie pooling krok, kde je okno na výpočet hodnoty na danej

Sigmoid

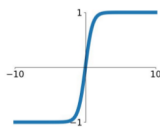
$$\sigma(x) = \frac{1}{1+e^{-x}}$$

**Leaky ReLU**

$$\max(0.1x, x)$$

**tanh**

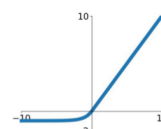
$$\tanh(x)$$

**Maxout**

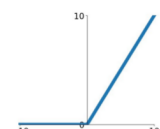
$$\max(w_1^T x + b_1, w_2^T x + b_2)$$

ELU

$$\begin{cases} x & x \geq 0 \\ \alpha(e^x - 1) & x < 0 \end{cases}$$

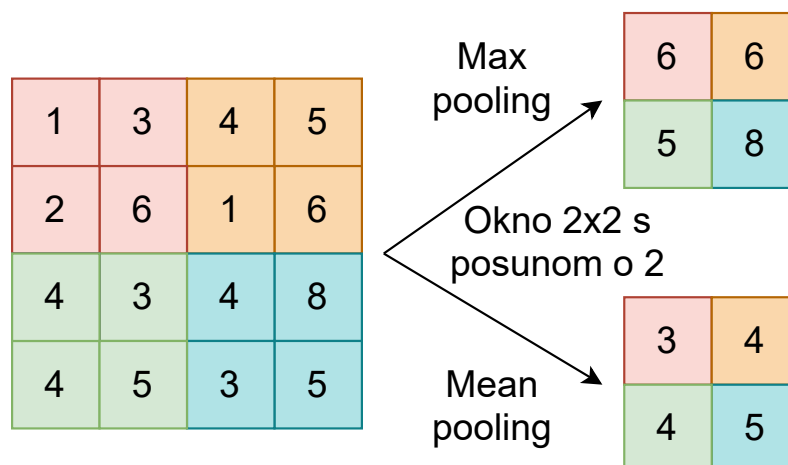
**ReLU**

$$\max(0, x)$$



Obr. 2.6: Prehľad rôznych aktivačných funkcií v hlbokom učení. Prevzaté a upravené z [24]

pozícií posúvané, dôjde k redukcii priestorových dimenzií danej príznakovej mapy. Toto môže byť výhodné čo sa týka zníženia celkového počtu parametrov, čiže zníženie pamäťovej a výpočtovej náročnosti. Poslednou funkciou pooling vrstvy je, že zmenšovaním počtu parametrov funguje vrstva ako forma regulácie, teda čiastočne obmedzuje možnosť preučenia siete. [25]



Obr. 2.7: Princíp max pooling a pooling z priemeru, inšpirované z: [26]

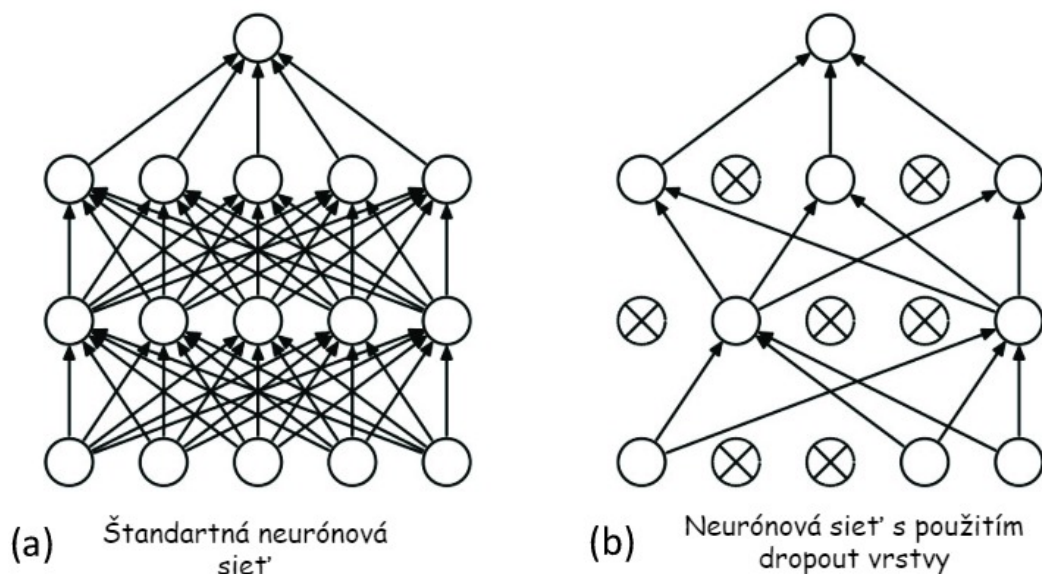
Skip connection layer

Skip connection layer sa využívajú na explicitné kopírovanie prvkov z predchádzajúcich vrstiev do nasledujúcich vrstiev. To zabraňuje neurónovým sieťam, aby sa v prípade potreby museli učiť funkcie identity. Jej hlavné funkcie sú prekonávanie

problémov miznúcich gradientov a tým pomáhajú pri šírení gradientov. Umožňujú naučiť sa funkciu identity v ďalšej vrstve, ktorá dostáva vstup z skip connection layer. To znamená, že výkon nasledujúcej vrstvy bude aspoň taký dobrý ako z predošlej, ale nie horší. [27]

Dropout layer

Dropout layer donucuje neurónovú sieť naučiť sa robustnejšie funkcie, ktoré sú užitočné v spojení s mnohými rôznymi náhodnými podmnožinami ďalších neurónov. Dropout vrstva zhruba zdvojnásobuje počet iterácií potrebných na konvergovanie, avšak tréning je kratšie na každú epochu. Zobrazenie funkcie dropout vrstvy na 2.8.



Obr. 2.8: Princíp dropout vrstvy v neurónovej sieti, upravené z: [28]

Transponovaná konvolučná vrstva

Transponovaná konvolučná vrstva (transposed convolutional layer) je tiež nesprávne známa ako dekonvolučná vrstva. Dekonvolučná vrstva zvráti činnosť štandardnej konvolučnej vrstvy, či ak je výstup generovaný prostredníctvom štandardnej konvolučnej vrstvy dekonvolvovaný, vráti sa späť pôvodný vstup. Transponovaná konvolyčná vrstva je podobná dekonvolučnej vrstve v tom zmysle, že priestorová dimenzia generovaná oboma je rovnaká. Transponovaná konvolúcia nezvráti štandardnú konvolúciu podľa hodnôt, ale iba podľa dimenzií. Na druhej strane transponovaná

konvolučná vrstva sa zvyčajne vykonáva na prevzorkovanie, teda na generovanie výstupnej mapy funkcií, ktorá má väčší priestorový rozmer ako mapa vstupných funkcií. Rovnako ako štandardná konvolučná vrstva, aj transponovaná konvolučná vrstva je definovaná veľkosťou kroku posúvania filtru a padding, vysvetlené v kapitole 2.7. [29]

3 Segmentácia obrazových dát

Segmentácia obrazu je kľúčovým bodom k jeho ďalšej analýze. Ide o proces, ktorý slúži na priradenie skupiny k pixelu alebo voxelu obrazu. Čo sa týka segmentačných algoritmov, na výber je veľké množstvo typov, no nie každý je vhodný pre každý segmentačnú úlohu.

3.1 Základné metódy segmentácie

Segmentačné metódy sa dajú rozdeliť podľa ich prístupu do niekoľkých skupín: [15]

Segmentácia podľa homogenity oblastí

Po anglicky Thresholding segmentation. Ide o najjednoduchšiu skupinu segmentačných metód, ktoré segmentujú obraz podľa predpokladu homogenity oblastí záujmu v obraze. V jednoduchom prípade môže ísť o jasovú hodnotu pixelov, naopak v zložitejšom o textúrne príznaky, no typickým zástupcom je jednoduché prahovanie. Predpoklad homogenity je taktiež aj slabinou tejto skupiny, kde môže napríklad nerovnomerným osvetľovaním alebo rozdielnymi textúrami v oblastiach rovnakej triedy dochádzať k chybám segmentácie. Výhodou metódy je, že nepotrebuje komplikovanú predprípravu dát. Príkladom je metóda Otsu či adaptívne a globálne prahovanie. [15]

Segmentácia orientovaná regiónmi

Metóda segmentácie založená na regióne hľadá podobnosti medzi susednými pixelmi. To znamená, že pixely, ktoré majú podobné atribúty, sú zoskupené do jedinečných oblastí. Ako pri všetkých technikách segmentácie, použité intenzity šedej je najbežnejším prostriedkom na priradenie podobnosti, ale existujú aj ďalšie možnosti, ako napríklad variancia, farba a multispektrálne znaky. Príkladom môže byť metóda povodia (Watershed method) alebo metóda rastu oblastí. Pracuje rozumne pre obrazy obsahujúce určitú hodnotu šumu. [30] [15]

Segmentácia orientovaná hranami

V tejto skupine metód sa sleduje prudká zmena intenzít pixelov v obraze. Cieľom je nájsť zatvorenú hranicu segmentu v obraze. Po podmienkou je, aby zmeny intenzít vnútri segmentu boli menšie, ako na jeho hranici. Metóda funguje dobre obrazy majúce dobrý kontrast medzi objektami. Príkladom môže byť detektor hrán alebo gradientný operátor. [15] [31]

Segmentačné metódy využívajúce aktívnych a pružných kontúr

Tieto segmentačné metódy vychádzajú z definovaných hraníc objektov, ktoré sú upravované tak, aby čo najlepšie odpovedali skutočným hraniciam objektov v obraze. Výhoda tejto metódy je, že vhodnú definíciu parametrov kontúr ide obmedziť vplyvom šumu v obraze na výslednú segmentáciu. [15]

Metódy hlbokého učenia

Ide o modernú skupinu metód, ktoré v súčasnosti dosahujú najlepších výsledkov medzi ostatnými segmentačnými metódami a sú podrobne rozpísané v ďalšej časti tejto práce.

3.2 Segmentácia obrazu

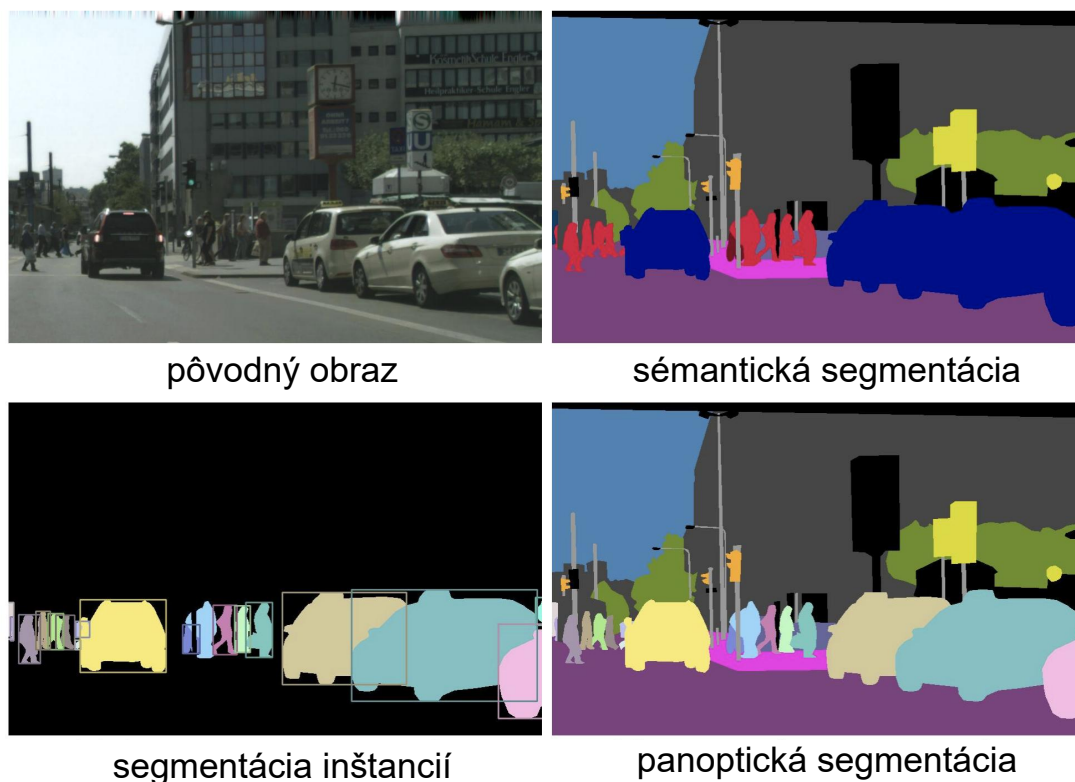
Štandardným prístupom pre segmentáciu obrazu je jej rozdelenie na dve úlohy: sémantickú segmentáciu a segmentáciu inštancií (Instance segmentation). Je tu potom ešte jeden typ, spájajúci oba spomenuté typy, a tým je panoptická segmentácia. Rozdelenie na 3.1. Sémantická segmentácia opisuje proces priradovania každého pixelu obrazu s triedou. Narozdiel od sémantickej segmentácie, segmentácia inštancií maskuje každú inštanciu objektu obsiahnutého v obraze nezávisle. Pojem objektová detekcia blízko súvisí so instance segmentation, kde experti ohraničujú polom každú objektovú inštanciu obrazu a pridávajú štítok triedy. Segmentácia inštancií dáva masku každej inštancií. [32]

3.3 Architektúry CNN vhodné na segmentáciu

U-Net

U-Net je konvolučná neurónová sieťová architektúra pre rýchlu a presnú segmentáciu obrazov. Jej tvar pripomína písmeno U. Môžeme jej architektúru rozdeliť na dve časti. Ide o kontraktibilnú expanzívnu dráhu, ktoré si sú symetricky podobné.

Kontraktibilná dráha pripomína typickú klasifikačnú konvolučnú neurónovú sieť. V každom jej kroku za sebou opakovane nasledujú určité vrstvy 3.2, a tým sú 2 konvolučné vrstvy (3x3) s aktivačnou funkciou ReLU a max pooling vrstva s krokom 2 pre podvzorkovanie. Behom kontrakcie sa zdvojnásobí počet príznakových máp, pričom ich veľkosť sa zmenší, vďaka čomu je sieť schopná nájsť veľmi komplexné príznaky.

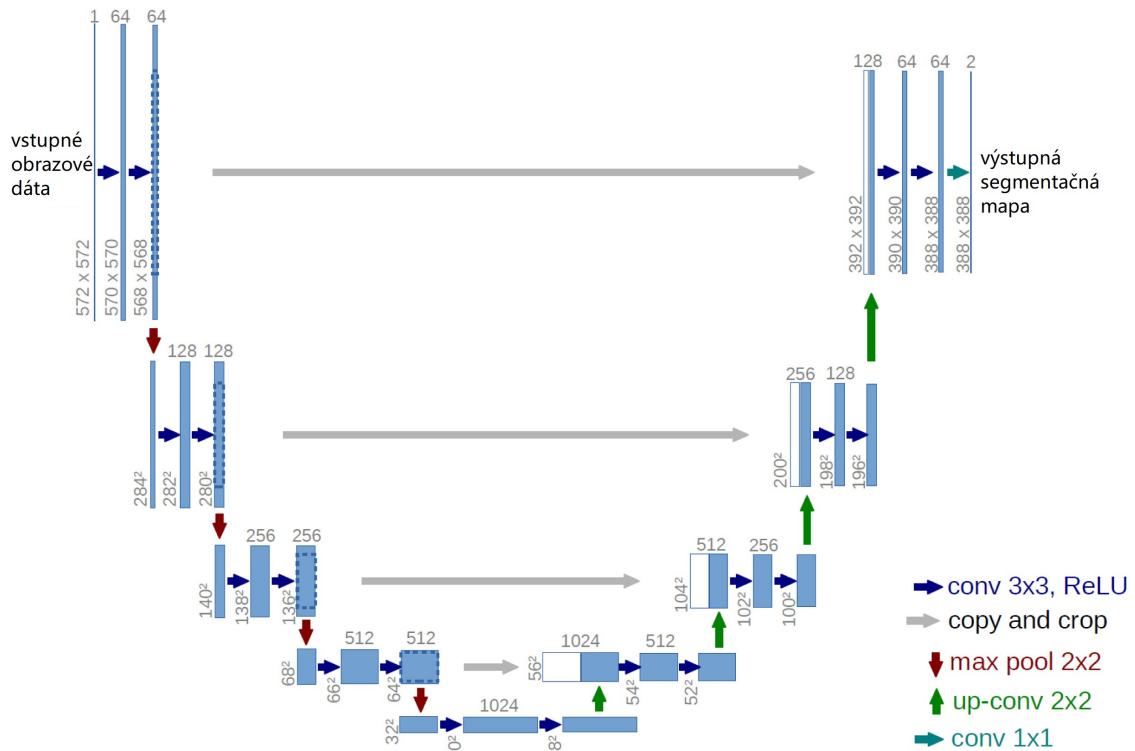


Obr. 3.1: Príklady jednotlivých typov obrazovej segmentácie, prevzaté a preložené z: [33]

V expanzívnej dráhe to ide skoro naopak. Najprv sa prevedie prevzorkovanie transponovanou konvolučnou vrstvou, ktorá zmenší počet príznakových máp na polovicu, ale zvýši ich veľkosť. Potom sa výsledok spojí s odpovedajúcou orezanou príznakovou mapou zo kontraktibilnej dráhy, orezaná z dôvodu straty hraničných pixelov pri každej konvolúcii a nasleduje 2 konvolučné vrstvy (3x3) s aktivačnou funkciou ReLU. Spojenie expanzívnej časti s kontraktibilnou časťou má za následok rekonštrukciu obrazu. Nakoniec sa prevedie konvolúcia (1x1) na mapovanie príznakového vektoru k danému počtu tried. U-Net model sa dá predučiť, ak práca s modelom má malé dáta, to dosiahneme enkodér U-Netu nahradíme inou sieťou, napríklad ResNet modelom. [34] [32]

Mask R-CNN

Architektúra Mask R-CNN je ďalším modelom vhodným na segmentáciu obrazu. Mask R-CNN je vylepšeným modelom Faster R-CNN, ktorý objekt lokalizoval pomocou štvorcového ohraničenia. Táto verzia teda najviac pridáva lokalizáciu pixelov každého objektu.

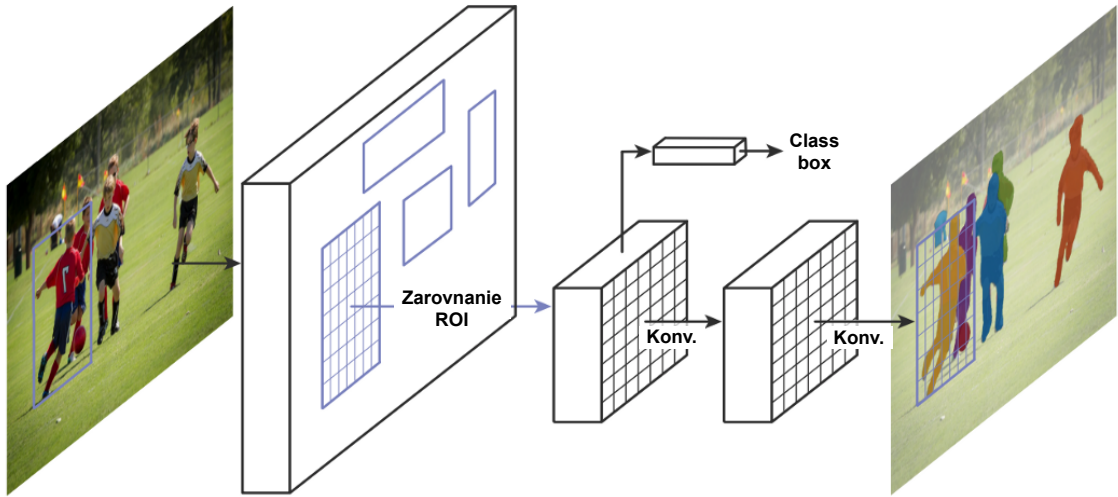


Obr. 3.2: Architektúra U-Net siete, conv pre konvolučnú vrstvu, max pool - pooling vrstva cez maximálne hodnoty, copy and crop - uloží a presunie výsledky do druhej časti U-Net, up-conv odpovedá transponovanej konvolučnej vrstve, prevzaté z: [34]

Mask R-CNN to robí pridaním novej paralelne pracujúcej vetvy, vidno na schéme Mask R-CNN 3.3, ktorej výstupom je binárna maska, ktorá určuje, či daný pixel je alebo nie súčasťou hľadaného objektu. Pre výpočet segmentácie už nie je ale dostatočné získavať dáta z mapy príznakov s ROI pooling operáciou. Dochádza totiž ku strate lokalizačných informácií z dôvodu kvantizačnej chyby, čo by bol problém pri tvorbe segmentačnej masky, lebo výsledná binárna maska by nebola zarovnaná vstupnému obrazu. Preto použitím zarovnania ROI, ROIAlign pre extrakciu regiónu záujmu z príznakovkej mapy, počíta totiž každú hodnotu pomocou bilineárnej interpolácie najbližších bodov na mriežke mapy príznakov. Po vygenerovaní binárnych masiek, Mask R-CNN ich skombinuje s klasifikáciou a štvorcovými ohraňovacími ešte, rovnaké z Faster R-CNN, čím je docieľená presne segmentácia objektu. [35]

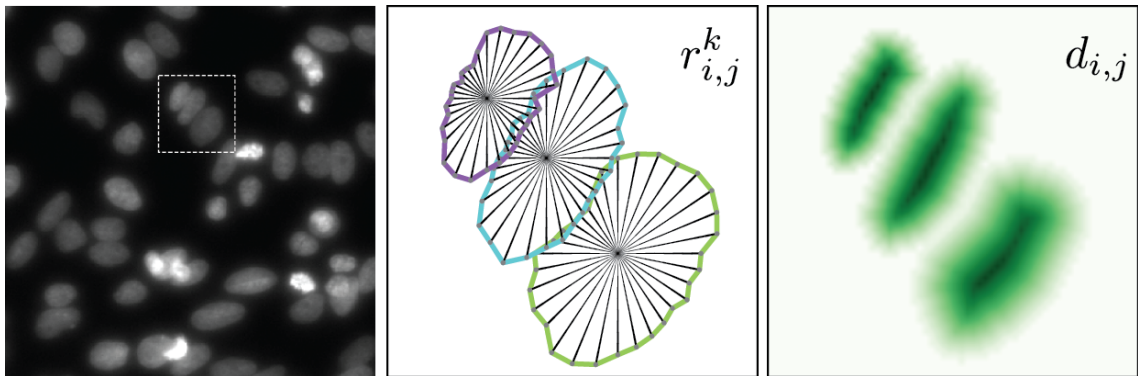
Stardist

Je to metóda, ktorá priamo predikuje tvary každého objektu záujmu. Stardist nepoužíva ohraňujúce polia, namiesto toho predikuje hviezdicovito konvexný mnoho-uholník pre každý pixel. Presnejšie, pre každý pixel s indexmi znižuje vzdialenosť k hranici objektu, ku ktorému pixel patrí, pozdĺž množiny n preddefinovaných radiál-



Obr. 3.3: Mask R-CNN sieť, prevzaté z: [35]

nych smerov s rovnako vzdialenými uhlami. Platí to iba pre pixely patriace do triedy, no Stardist sa aplikuje na každý pixel a potom sú už pixely posudzované podľa ich objektovej pravdepodobnosti, tu sa práve používa nie maximálna supresia (NMS), aby model dospel k množine polygónov prezentujúcich individuálnu inštanciu objektu. Ako výsledky sa dostane teda dištančná mapa a objektové pravdepodobnosti, na ktoré použijeme NMS, čo nám spôsobí separáciu jednotlivých objektov v obraze. Vizuálne zobrazenie hviezdicovito konvexného mnohouholníka a objektovej pravdepodobnosti na 3.4 [36] [37]

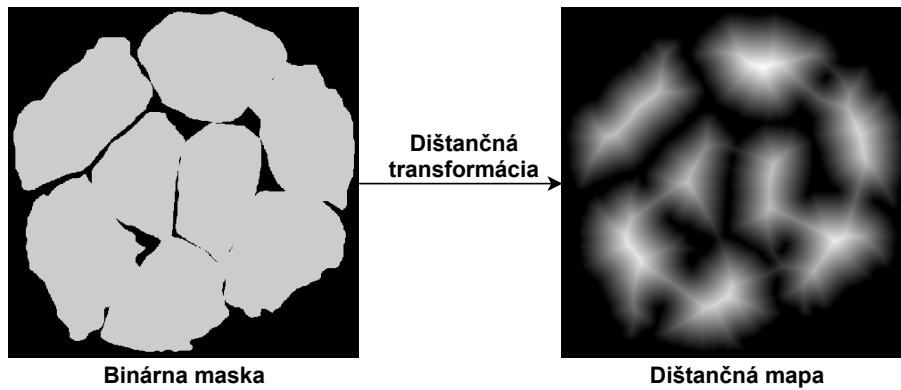


Obr. 3.4: Zľava: pôvodná snímka, hviezdicovito konvexný mnohouholník, objektová pravdepodobnosť, upravené z: [36]

3.4 Dištančná transformácia

Dištančná transformácia (DT) je operátor, ktorý sa zvyčajne aplikuje na binárne obrazy, viď 3.5. Výsledkom transformácie je šedo-tónový obraz, kde jasové hodnoty pixelu sa líšia podľa ich vzdialenosti k najbližšiemu pixelu pozadia, kde čím väčšia vzdialenosť je medzi pixelom objektu a pozadia, tým väčšia intenzita jasu a naopak. Teda hodnota jasu klesá od najvzdialenejšieho bodu smerom k pozadiu, kde pozadie je 0. Existuje niekoľko rôznych druhov transformácie vzdialenosti, podľa toho, ktorá metrika vzdialenosti sa použije na určenie dištancie medzi pixelmi, príklady použitých metrík môžu byť Euklidovská vzdialenosť, Manhattanská vzdialenosť. [38] Medzi najpoužívanéjšie metriky patrí Euklidovská vzdialenosť, pri ktorej platí, že ak majú dva pixely, ktorých vzdialenosť sa ráta, koordinácie (x_1, y_1) , čo sú súradnice aktuálneho pixelu a (x_2, y_2) , súradnice najbližšieho pixelu pozadia, potom Euklidovská vzdialenosť je daná vzorcom:

$$D_e = \sqrt{(x_2 - x_1)^2 + (y_2 - y_1)^2}. \quad (3.1)$$



Obr. 3.5: Zľava: binárna manuálna maska, vytvorená dištančná mapa

3.5 Metóda povodia

Metóda v anglickom preklade ako metóda Watershed, rieši problematiku segmentácie z pohľadu geografickej podobnosti. Hodnoty obrazu je možné brať ako topografický reliéf, v ktorom maximálne hodnoty jasu tvoria pohoria a naopak minimálne hodnoty údolia. V našom prípade okolie bunky je označované maximálnou hodnotou a naopak stred bunky minimálnom, medzi stredom bunky k jej okraju sa hodnoty zvyšujú. Principiálne sa tento terén postupne začne zaplavovať vodou, ktorej pramene sa nachádzajú práve v minimálnych hodnotách jasu, teda v údoliach. Jednotlivé pramene tvoria segmentované oblasti. V mieste prechodu medzi jednotlivými

oblastami sa vytvára hranica. Algoritmus sa ukončí po dosiahnutí maximálnej hodnoty jas. Do Watershed metódy vstupuje binárna maska a súčasne dištančná mapa. Výstupom tejto metódy je väčšinou veľké množstvo segmentovaných oblastí, ktoré nemusia odpovedať reálnemu objektu. Pre dosiahnutie odpovedajúcich výsledkov je potrebné tieto oblasti postupne spájať. [39]

Metóda povodia riadená značkami

Ukázalo sa, že táto metóda, v anglickom jazyku The marker-controlled Watershed, je robustná a flexibilná metóda segmentácie objektov s uzavretými obrysami, kde hranice sú vyjadrené ako vyvýšeniny. Obrázok značky je binárny, kde je sú značky buď ako jednotlivé pixely alebo ako väčšie regióny, kde každé značenie je vo vlastnom objekte záujmu. Počet značení by mal byť rovnaký s Watershed regiónmi. Značenia môžu byť vybraté manuálne alebo automaticky.

3.6 Hodnotiace metriky pre sémantickú segmentáciu

Dice koeficient (DSC)

Dice koeficient je bežne používaná metrika na hodnotenie kvality segmentácie vzhľadom na referenciu. Jeho zobecnená verzia bola použitá aj ako kritériálna funkcia. Hodnotenie ide od 0 ku 1, kde smerom k nule sa segmentácie neprekrývajú vôbec a naopak smerom k 1 sa prekrývajú viac a viac. Vzorec pre výpočet Dice koeficientu:

$$DSC = \frac{2TP}{2TP + FP + FN} \quad (3.2)$$

Jaccard koeficient (JSC)

Jaccard koeficient predstavuje prísnejšiu metriku kvality segmentácie ako Dice koeficient. No rozdiel vo vzorci je iba v počte pozitívnych pixelov, vzorec pre Jaccard koeficient:

$$JSC = \frac{TP}{TP + FP + FN} \quad (3.3)$$

3.7 Hodnotiace metriky pre segmentáciu inštancií

Hodnotenie presnosti segmentácie (SEG)

Hlavnou úlohou SEG hodnotiacej metriky je porozumieť, ako dobre sa segmentované regióny zhodujú s aktuálnymi regiónmi. SEG metrika ráta na princípe Jaccard koeficientu s najviac jednou podmienkou, že ak zhoda medzi objektom, konkrétne

bunkou, na maske manuálnej segmentácie s bunkou z automatickej segmentácie je ≤ 0.5 , do celkového výpočtu priemeru dávame 0 miesto reálnej hodnoty. Princípne fungovanie SEG je hľadanie najväčšieho prekrytia pre každý referenčný objekt, s objektom sa porovnajú všetky predikované objekty a najväčšie prekrytie sa uloží, na konci sa finálna hodnota dostane spriemerovaním všetkých hodnôt prekrytia referenčných objektov.

Priemerná presnosť (AP)

SEG metrika ale neráta s falošne pozitívnymi hodnotami, teda bunkami, ktoré sa vytvorili v automatickej segmentácii, no v manuálnej segmentácii nie sú. V metrike AP sa zohľadnené. Dôležité je zistiť hodnoty jednotlivých referenčných objektov a určiť či sú pravdivo pozitívne, ak je prekrytie väčšie ako prah, alebo falošne negatívna, teda ak sa k ref. objekt neprekrýva so žiadnym predikovaným. Rovnako tak pri predikovaných hodnotách, predik. objekty, ktoré boli prekryté s ref. objektmi, sa nemusia rátať a potom tie, ktoré neboli prekryté, sa berú ako falošne pozitívne hodnoty. Spriemerovaním všetkých AP skóre vyjde priemerná hodnota úspešnosti pre daný prah metrikou AP. Prahy sa môžu postupne zvyšovať, z čoho potom vyjdu priemerné hodnoty pre rôzne prahy, kde je vidno určitá vzťah medzi úspešnosťou a veľkosťou prahu.

4 Tvorba datasetu, návrh a implementácia

Návrh a implementácia prebehla v programovacom jazyku Python s knihovňou určenou na hlboké učenie. Programovacie prostredie bolo použité Spyder, vedecké vývojové prostredie pre Python (the Scientific Python Development Environment), ktorý bol preinštalovaný v Anaconda Navigator. V návrhu siete sme použili nepredučenú sieť U-Net 3.2, ktorá bola neskôr preučená na obrazových bunkových dátach, ale taktiež predčlený U-Net model.

4.1 Dataset

Je tvorený dvomi typmi ľudských prostatických buniek PC-3 a 22Rv1, ktoré sú ďalej delené podľa rezistencie k zinku.

Bunečné línie

V práci boli použité bunkové línie PC-3 a 22Rv1 odvodené z primárneho a metastatického karcinómu prostaty. Jedná sa o adherentné nádorové bunky s rôznym stupňom agresivity odvodené z epitelového tkaniva. Morfológicky sa oba typy buniek od seba zásadne odlišujú. S cieľom zvýšiť heterogenitu datasetu boli v práci využité ešte modifikované línie odvodené od vyššie spomenutých - zinok rezistentné varianty PC-3 a 22Rv1. Bunky boli pripravované v laboratóriu Michala Masaříka. [40]

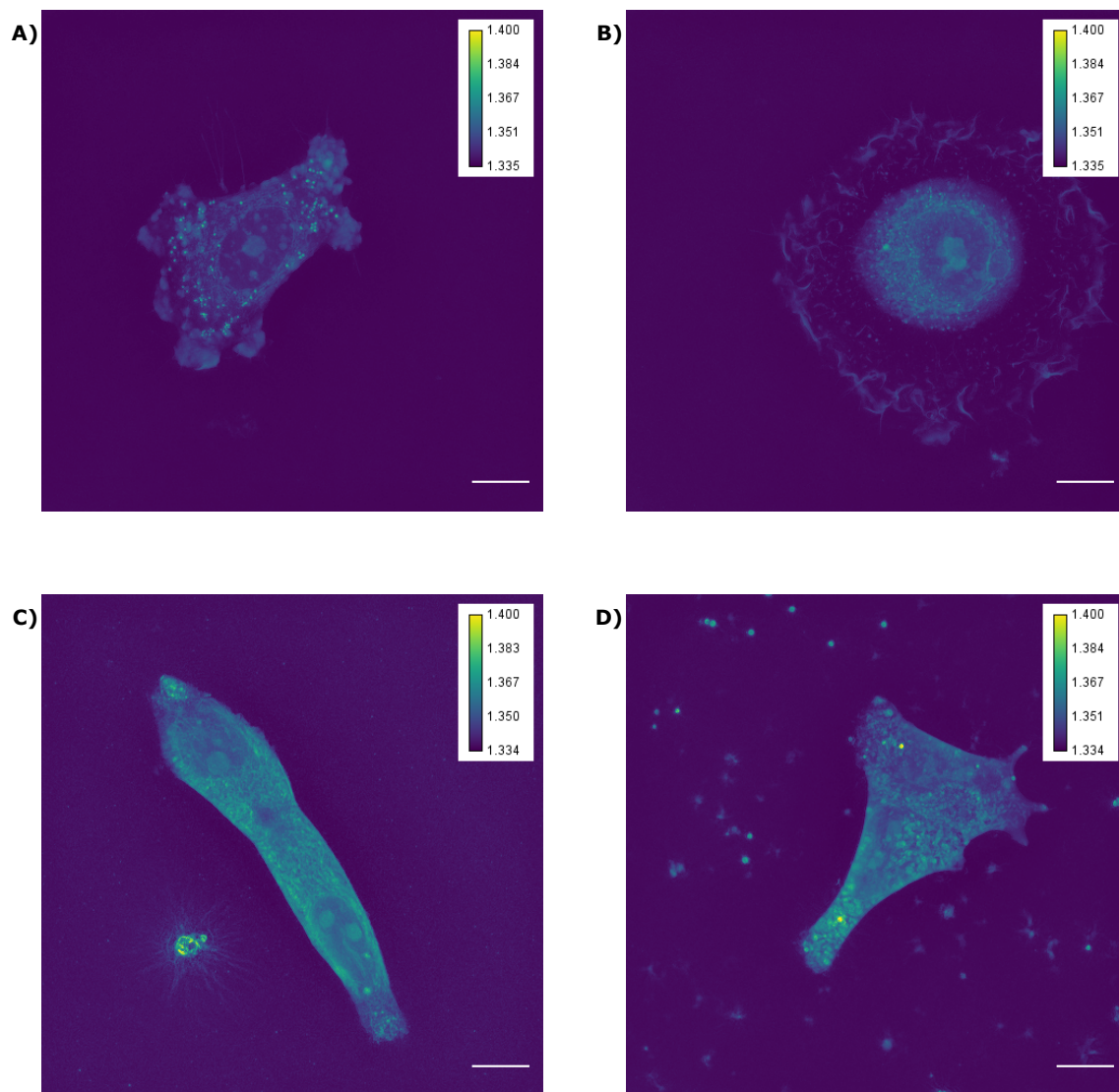
Kultivácia buniek

Bunky 22Rv1 boli kultivované v RPMI-1640 médiu s 10% FBS. PC-3 bunky boli kultivované v médiu Ham's F12 s 10% FBS. Obe média boli naďalej doplnené antibiotikami (penicilín 100 U/ml and streptomycín 0.1 mg/ml). Bunky boli udržiavané pri 37°C v inkubátore s vlhkosťou 60% a s 5% CO₂ (Sanyo, Japan). Obe bunkové línie boli kultivované v laboratóriu Michala Masaříka na Lekárskej fakulte Masarykovej univerzity. [40]

Mikroskopia a akvizícia dát

Snímanie sa uskutočňovalo pomocou optickej difrakčnej tomografie cez 3D Cell Explorer (Nanolive SA, Lausanne, Switzerland) s objektívom 60x / 0,8., ktorý poskytuje kvantitatívne informácie (tomografia indexu lomu) živých buniek. Index lomu kultivačného média F12 spoločnosti Hamam bol nameraný ako 1,335, nameraný pomocou digitálneho refraktometra. Oba typy buniek PC3 a 22Rv1 boli kultivované v samostatných komorách ibidi μ -Slide Luer 0,8. Pri snímaní boli teda vytvorené

jedinečné štyri datasety po okolo 200 3D obrázkov. PC-3 a 22Rv1 pôvodné a ich modifikované línie zinok rezistentné. Pre všetky kategórie bolo urobené podobné množstvo snímok buniek. Využilo sa Steve, mikroskopový softvér poskytovaný spoločnosťou Nanolive, používaný k ovládaniu mikroskopu a generovania 32 bitových TIFF Z-stackov z nasnímaných hologramov. Veľkosť FOV bola $94 \times 94 \times 35 \mu\text{m}$. Výsledným súborom dát bolo 715 snímok buniek rovnovážne kategoricky rozdelených, na ktorých sa mohlo nachádzať okolo 1500 jednotlivých buniek. Obe bunkové línie zobrazené na 4.1 [41]



Obr. 4.1: Príklady rezov z tomogramov refrakčného indexu, bunkové línie PC-3 a 22Rv1 - A: PC-3 pôvodné, B: PC-3 zinok rezistentné, C: 22Rv1 pôvodné, D: 22Rv1 zinok rezistentné, scale bar odpovedá $10 \mu\text{m}$.

Anotácia a predpracovanie dát

Každý obrázok bunky bol manuálne segmentovaný, čo poskytlo segmentované masky buniek, jadier a jadierok. Na manuálnu segmentáciu bol použitý program ImageJ. Tieto masky budú slúžiť ako referenčné obrázky v procese tréningu neurónových sietí. Kvôli relatívne nízkej hodnote rozlíšenia v tretej dimenzii obrázka a používanie všetkých 96 rezov ako vstup by bolo výpočtovo náročné, bolo teda vhodné originálny 512x512x96 3D obrázok prekonvertovať na jedno-kanálový 2D obrázok 32 bitový rôznymi spôsobmi: (1) spriemerovaním cez tretiu dimenziu, (2) projekciu maximálne intenzity cez tretiu dimenziu, (3) projekciou štandardnej derivácie cez tretiu dimenziu a (4) výberom rezu s najväčšou hodnotou entropie, čiže najostrejší rez. Dáta modifikované týmito spôsobmi obsahujú stále väčšinu informácie potrebnú pre segmentačné účely. Naše dáta boli normalizované použitím Z skóre, aby si zaistili ich homogenitu. Každý typ prevedeného 2D obrázka sa normalizoval jednotlivo, pričom sa zodpovedajúce hodnoty strednej a štandardnej odchýlky vypočítali z celého súboru údajov.

Augmentácia dát

Vzhľadom ku komplexnosti morfológie sub-celulárnych štruktúr a relatívne obmedzenej veľkosti datasetu, je implementácia augmentácie nevyhnutná na získanie intenzívnej schopnosti tréningu a tým dosiahnuť požadované výsledky. Naš augmentačný algoritmus pozostáva z: (1) pridanie náhodného čísla z predom definovaného rozsahu, (2) násobenie náhodným číslom z predom definovaného intervalu, (3) afinná transformácia (náhodná rotácia, náklon), a (4) náhodné rozmazanie a zostrenie. Všetky tieto parametre augmentácie boli nastavené na základe predchádzajúcej optimalizácie.

4.2 Sémantická segmentácia

Na sémantickú segmentáciu bol vytvorený a naučený model U-Net pre binárne masky, ktorým výstupom boli predikované masky buniek a sub-celulárnych regiónov (jadier a jadierok). Tieto automatické masky boli porovnávané referenčnými manuálnymi maskami. Výsledok by mali byť rozdelené bunky vzhľadom ku pozadiu obrázka, teda predikované/automatické masky. Z dôvodu, že už aj pri manuálnom segmentovaní, ale rovnako tak aj pri predikovanom mohli nastať chyby, kedy časť jedného regiónu jednej bunky (jadra, jadierka) presahoval do regiónu druhej. Z toho dôvodu nie sú viditeľne separované bunky, ale vnikajú spoločné veľké objekty, práve kvôli čomu museli byť vykonané ďalšie kroky vedúce k segmentácií inštancií, a teda k separovaniu jednotlivých objektov v obraze.

Trénovanie siete U-Net pre binárne masky

Pre účely tejto práce bola vybranou neurónovou sieťou U-Net, najbežnejšie používanou architektúrou pre segmentáciu biologických, medicínskych obrazov, ako aj predučný U-Net klasifikačný enkodér na ImageNet databáze, s ResNet18 kódovacom na porovnanie a prípadnému zlepšeniu výsledkov. Obe siete boli trénované na všetkých štyroch typoch vyššie spomenutých 2D obrázkoch osobitne a potom pre všetky štyri dokopy. Pre správne segmentovanie všetkých tri oblastí (bunka, jadro a jadierko) bolo potrebné natrénovať tri samostatné modely, jednu pre každý región a typ vstupného obrázku. Výsledkom toho bolo spolu 30 trénovaných modelov. Každý model bol trénovaný s rovnakými nastavenými parametrami na základe dôkladného testovania a optimalizácie, kde boli nastavované rôzne parametre a sledované ich účinky na učení sietí. Parametre tréningu boli: Ako optimalizačný algoritmus bol použitý Adam s rýchlosťou učenia 0.0005. Kriteriaálna funkcia bol použitý Dice loss. Trénovanie prebehlo na 1000 iteráciách, s batchom a validačným batchom 8 a 4. Do siete vstupovali predpracované obrazy buniek oboch líní PC-3 a 22Rv1, a ako požadovaný výstup slúžili ich masky, vytvorené manuálnym segmentovaním.

4.3 Segmentácia inštancií

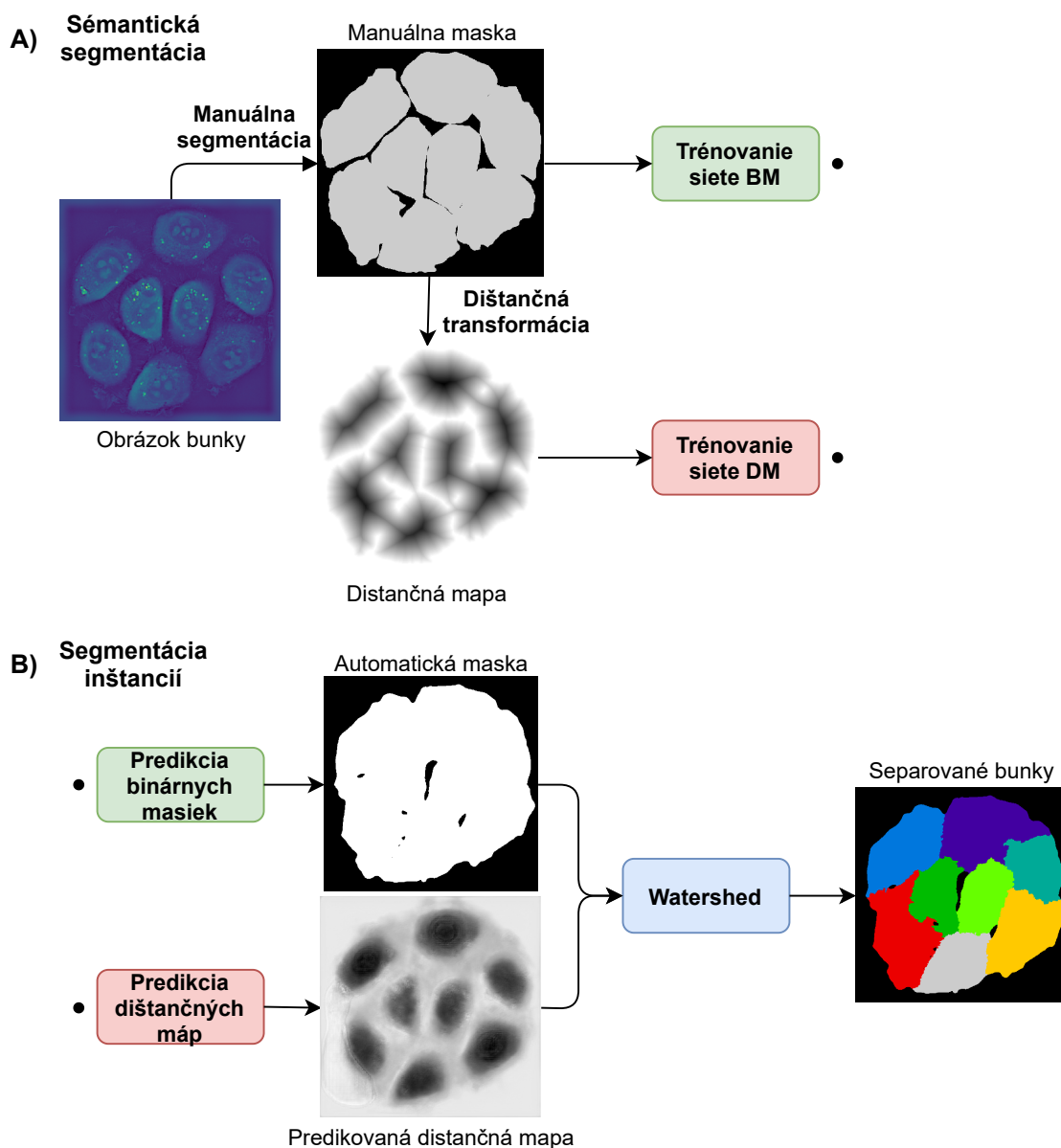
Separácia práve spojených buniek zo sémantickej segmentácie bola vykonaná segmentáciou inštancií, ktorá okrem už natrénovaného modelu natrénovala ďalší, predučný U-Net pre predikciu dištančných máp. Tie boli potrebné pre správnu separáciu pomocou metódy Watershed, teda dištančné mapy ukazujú vzdialenosť pixelu v objekte od hranice objektu a pozadia, čím ďalej od hranice, tým väčšia hodnota. Práve kvôli tomuto bolo potom možné nastaviť správne minimá vo funkcií Watershed a teda správnej separácií jednotlivých objektov v obraze.

Trénovanie siete U-Net pre dištančné mapy

Na trénovanie modelu pre predikciu dištančných máp bol použitý iba predučný U-Net a typ vstupného obrázku bol výber rezu s najväčšou hodnotou entropie preto, lebo v doterajších výsledkoch z tréningu modelu pre binárne masky vyšla táto kombinácia najlepšie. Ako referenčné obrázky slúžili vzniknuté dištančné masky z manuálnych masiek cez dištančnú transformáciu použitím Euklidovskej vzdialenosti. Parametre modelu sa zhodovali s tým pre binárne masky, okrem kriteriaálnej funkcie, kde sme miesto Dice loss použili MSE, teda priemernú štvorcovú chybu.

Implementácia metódy Watershed

Ako vstupy do metódy Watershed nám vstupovali automatické binárne masky a predikované distančné mapy. Výsledkom sme dostali obrázok, na ktorom každej bunke, oblasti, boli pridelené rovnaké hodnoty pixelov pre skupinu, čo spôsobilo označenie jednotlivých objektov na obrázku od hodnoty jeden a vyššie. Označené bolo aj pozadie, ktorého priradená hodnota pixelov bola nula. Týmto sme dostali separované bunky na danom obrázku. Dôležitým bodom bolo pridanie dištančných máp s prevrátenými hodnotami, kde minimá tvorili základne jednotlivých buniek, no ak by tam boli takto pridané do vstupu dištančné mapy, nedostali by sme separované bunky ako jednotlivé objekty, ale náhodné malé regióny, kvôli veľkému množstvu lokálnych minim. Aby sa teda zabránilo vytvárať jednotlivé regióny v každom lokálnom minime, bol pridaný parameter minimálna dištancia, ktorého hodnota zabezpečila, že v určitej vzdialenosti od minima sa neoznačovali iné bunky. Vytvorené teda boli značenia, ktoré miesto jedného pixelu ako základňa bunky, boli určité regióny, nachádzajúce sa v hľadaných objektoch buniek a týmto sa odstránili ako aj lokálne minimá, tak aj ich nepriaznivé účinky.



Obr. 4.2: A) Tvorba manuálnych masiek z nasnímaných obrázkov buniek oboch bu-
nečných línií, následná tvorba dištančných máp cez transformáciu vzdialenosti a
vstup manuálnych masiek a ich dištančných máp do jednotlivých U-Net sietí na
trénovanie, B) Predikcia automatických masiek a dištančných máp z netrénovaného
U-Netu a následne ich použitie ako vstupy do Watershede na separáciu jednotlivých
buniek v jednom obrázku. BM - binárne masky, DM - dištančné mapy

5 Výsledky a diskusia

Z dôvodu, že Jaccard koeficient a metriky využívajúce Jaccard koeficient predstavujú prísnejšie metriky ako metriky využívajúce Dice koeficient, boli výsledky prezentované primárne pomocou Jaccard koeficientu. Dice koeficient je spomenutý vzhľadom k jeho početnosti využitia v iných štúdiách [42] [43] z dôvodu porovnateľnosti. Hodnotiace metriky na 3.6.

5.1 Výsledky dosiahnuté pri sémantickej segmentácii

Sémantická segmentácia buniek

Cielom sémantickej segmentácie buniek bolo najprv testované optimálne predpracovanie dát. Porovnávané boli tieto typy projekcie pôvodného snímaného 3D obrázka: mean projekcia, max projekcia, projekcia cez rez s maximálnou entropiou, std projekcia a kombinácia ich všetkých štyroch predošlých dokopy. Ako vstupy boli použité pre zvýšenie heterogenity obe bunkové línie PC-3 a 22Rv1. Bolo zistené, že pre segmentáciu buniek sú najvhodnejšie projekcie max, entropy a std, ktoré dosahovali všetky okolo 0.66 Jaccard hodnôt, viz tabuľka 5.1. Kombinácia všetkých štyroch dosiahla rovnaké relatívne podobné výsledky, ale kvôli zvýšenej výpočtovej náročnosti neprináša zásadný benefit.

Tab. 5.1: Priemerné Jaccard koeficienty (Dice koeficienty) bunkových línií PC-3 a 22Rv1 pre rôzne typy projekcií a bunky na testovacích dátach použitím oboch neurónových sietí.

Typ vstupov	U-Net nepredučený	U-Net redučený
Mean projekcia	0,60 (0,75)	0,72 (0,84)
Max projekcia	0,66 (0,80)	0,71 (0,83)
Entropy projekcia	0,65 (0,79)	0,71 (0,83)
Std projekcia	0,66 (0,80)	0,72 (0,84)
Kombinácia všetkých	0,65 (0,79)	0,71 (0,83)

V ďalšom fáze bol testovaný vplyv redučenej U-Net siete na oboch bunečných líniách a taktiež na všetky typy projekcií. Týmto sme zistili tri hlavné poznatky, (1) redučený U-Net dosahuje lepšie výsledky ako nepredučený model, (2) ďalej vidíme najväčší nárast pri mean projekciu, čo môže nasvedčovať tomu, že mean projekcia je citlivá na veľkosť a rozmanitosť datasetu, (3) a nakoniec pri redučenom U-Net je z výsledkov 5.1, vidieť, že oproti významnejším rozdielom vo voľbe projekcie pre segmentáciu nie je pri aktívnom redučení voľa projekcie pre kvalitu segmentácie

významná, rozdiely sa pohybujú v stotínach Jaccard koeficientu, a teda pri tomto modeli nám nezáleží na výbere z testovaných typov projekcie. Pokračovaním bolo zistenie vplyvu typu bunečnej línií. Na to sme využili už získaný fakt, že predučný U-Net model podáva lepšie výkony a na výbere projekcie nezáleží, vybrali sme kvôli iným kritériám (ďalej v segmentácii sub-celulárnych štruktúr) projekciu cez rez s maximálnou entropiou. Výsledky z tabuľky 5.3 indikujú, že bunky z PC-3 línie sa segmentujú lepšie ako 22Rv1 bunky. Toto spôsobuje fakt, že tieto bunečné línie sú úplne morfológicky od seba odlišné, 22Rv1 majú početné bunkové kontakty, čo môže byť zapríčinené rozdielnou morfológiou oboch buniek. Metrika segmentácie dvoch bunečných typov bola v hodnotená zvlášť, bunky PC-3 sú pri kultivácii na plochej miske typicky kupolovité s nahromadením bunečnej masy v strednej časti a s jej postupným poklesom k okrajom. Toto však nie je zrejmé pri bunkách 22Rv1, ktoré vytvárajú tesné spojenia s okolitými bunkami bez významného poklesu refrakčného indexu na periférii buniek. Okraje buniek 22Rv1 sú tým pádom ťažšie rozoznateľné taktiež zrakom a preto sú v práci použité ako model obtiažne segmentovateľných buniek. Posledným cieľom bolo generovať automatické masky buniek k pozadiu bez jednoznačnej separácie jednotlivých buniek, viď 5.1 5.2. Na generovanie automatických masiek bol použitý, podľa doterajších zistení predučný model s entropie projekciou. Chyby mohli zvyknúť pri manuálnom segmentovaní, čo mohlo zhoršiť výsledky našich modelov, keďže niekedy sieť predikovala automatické masky lepšie, ako bola ich referenčná maska.

V [42] sa porovnávalo rôzne metódy snímania buniek, metódy, ktoré si značia bunky, alebo sub-celulárne regióny, ktorými sa ale priamo zasahuje to náture buniek, ale tiež bolo použité kvantitatívne fázové snímanie (QPI), rovnako ako v tejto práci. V práci [42] sa pracovalo iba s bunkami a nie ich sub-celulárnymi oblasťami. Okrem rôznych snímacích techník boli tiež skúšané iné metódy sémantickej segmentácie buniek. Ich výsledky sa podľa metódy líšili v rozmedzí 0.62 až 0.96 Dice koeficientu. Najúspešnejším výsledkom tejto práce bol 0.84, týmto sa môže povedať, že náš model sa umiestil niekde v strednej pričke medzi metódami z porovnávanou prácou.

Sémantická segmentácia sub-celulárnych štruktúr

Úmyslom sémantickej segmentácie sub-celulárnych štruktúr bolo rovnako ako pri segmentácii buniek vytvoriť automatické masky pre jadrá a masky pre jadierka. Postup bol tiež veľmi podobný ako pri segmentácii buniek, rozdiel bol v type masiek manuálnej anotácie, teda neboli to manuálne masky buniek, ale v tomto prípade jadier, jadierok, ukážky na 5.1 5.2. Počet modelov sa tu zdvojnásobil, kvôli potrebe trénovania separátnych modelov pre jednotlivé sub-celulárne štruktúry, z čoho vyšlo 20 modelov, keďže máme dva modely, dokopy päť rôznych projekcií a analyzované 2

sub-celulárne regióny. Priemerné hodnoty oboch hodnotiacich metrík v tabuľke 5.2. Pri segmentácii jadier a jadierok je zreteľný očakávaný pokles presnosti segmentácie priemerne o 0,2 Jaccard skóre oproti segmentácii buniek. Súčasne ale platí, že vplyv predučenia tu má viac zreteľnejší efekt ako pri segmentácii buniek, pri segmentácii jadier až priemerne okolo 22% zlepšenia segmentácie. Najúspešnejšie výsledky dosiahol pre jadrá predučný model U-Net s mean projekciou ako vstupné obrázky s hodnotou 0,65, a pre jadierka predučný model U-Net s entropy projekciou ako vstupné obrázky, konkrétne 0,46.

Tab. 5.2: Priemerné Jaccard koeficienty (Dice koeficienty) bunkových línií PC-3 a 22Rv1 pre rôzne typy vstupných obrázkov a sub-celulárnych regiónov na testovacích dátach použitím oboch neurónových sietí.

Typy vstupov	U-Net nepredučný		U-Net predučný	
	Jadro	Jadierko	Jadro	Jadierko
Mean projekcia	0,42 (0,59)	0,28 (0,44)	0,65 (0,79)	0,43 (0,60)
Max projekcia	0,44 (0,61)	0,33 (0,50)	0,63 (0,77)	0,42 (0,59)
Entropy projekcia	0,45 (0,62)	0,36 (0,53)	0,64 (0,78)	0,46 (0,63)
Std projekcia	0,39 (0,56)	0,32 (0,49)	0,64 (0,78)	0,44 (0,61)
Kombinácia všetkých	0,40 (0,57)	0,34 (0,51)	0,64 (0,78)	0,45 (0,62)

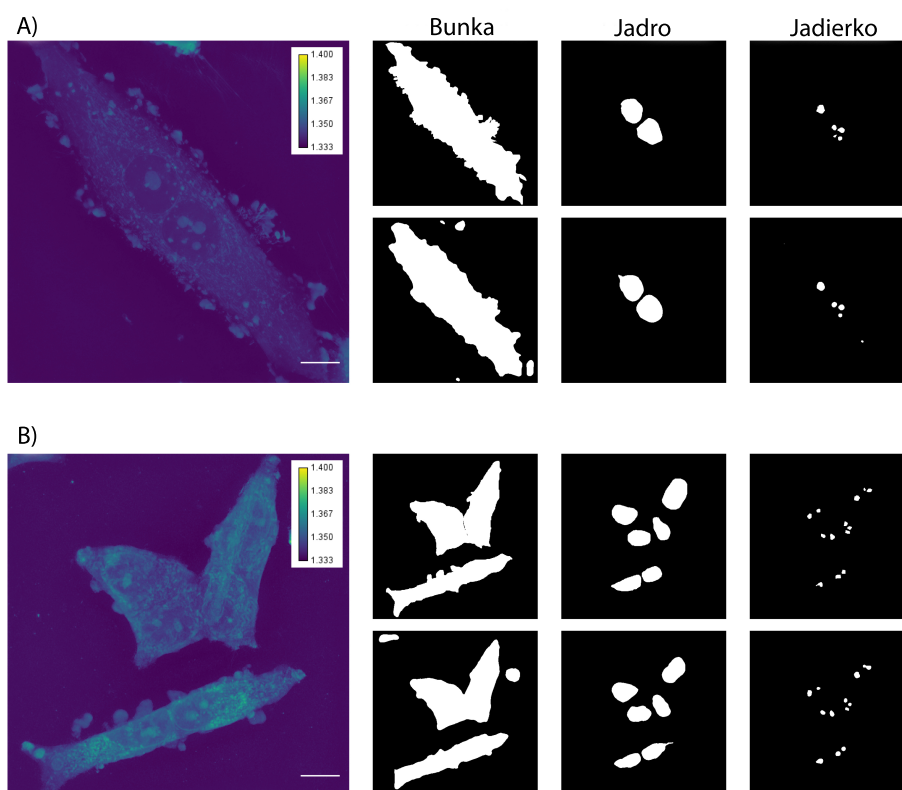
Je možné vidieť viditeľný nárast úspešnosti pri segmentácii použitím predučenej U-Net siete miesto nepredučenej. Pri jadrách sa úspešnosť zdvihla okolo 20% a pri jadierkach okolo 10%. Rovnako ako pri sémantickej segmentácii buniek nie je vidno žiaden relatívny nárast úspešností pri použití kombinácií všetkých štyroch anotáciách naraz, úspešnosť nenarastá a iba sa zvyšuje výpočtová náročnosť. Výsledky indikujú, že segmentácia PC-3 bunkovej línie prebehla úspešnejšie ako segmentácia 22Rv1 bunkovej línie, pri ktorých úspešnosť výrazne poklesol pri predikciách masiek sub-celulárnych regiónov. Chybovosť mohla byť spôsobená nepresnosťou manuálnych masiek, pri sub-celulárnych oblastiach obzvlášť, keďže masky jadier, skôr teda jadierok obsahovali niekoľko pixelov, bolo náročné vytvoriť manuálnu masku s dostatočnou presnosťou.

Štandardnou technikou súčasnej sub-celulárnej morfolologickej analýzy je mikroskopia s využitím fluorescenčného označovania. To dokazuje vysoké miery špecifity pre konkrétny proteín alebo organely, čo je možné vidieť v práci [43], kde práve použitím fluorescenčného označovania dosiahli Dice koeficienty segmentácie jadier podľa metódy v rozsahu 0,89 až 0,94, a práve možno kvôli použitiu označovacej techniky, konkrétne fluorescenčnej, získali okolo 10-15% úspešnejší výsledok ako naša práca (0,78), ale za cenu, že narušili národu buniek. Fluorescenčné značenie je ale významným zásahom do fyziologických procesov v bunke, a preto bol cieľom tejto práce

zistiť mieru špecificity fluorescenčne neoznačeného obrazu optickou difrakčnou tomografiou.

Tab. 5.3: Priemerné Jaccard koeficienty pre PC-3 a 22Rv1 bunkové línie a ich subcelulárne regióny na testovacích dátach použitím preučenej siete U-Net a rezom s najväčšou entropiou ako vstup.

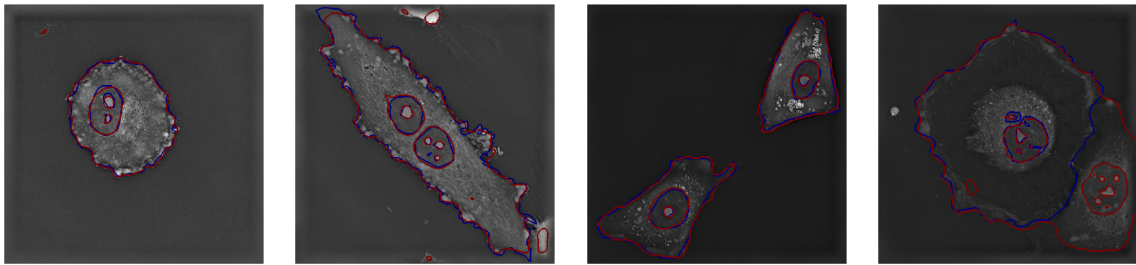
Bunková línia / Región	Bunka	Jadro	Jadierko
PC-3	0,75	0,71	0,57
22Rv1	0,65	0,55	0,34



Obr. 5.1: Príklady A) PC-3 buniek a B) 22Rv1 buniek, kvantitatívne fázové snímání, max projekcia, mierka indikuje $10\ \mu\text{m}$; ich odpovedajúce binárne masky tvorené s manuálnymi anotovanými maskami buniek (horné riadky) v porovnaní s binárnymi maskami generovanými modelom s najlepším výkonom (dolné riadky), preučená U-Net sieť a rez s najväčšou entropiou ako vstupy.

5.2 Výsledky dosiahnuté pri segmentácii inštancií

Cielom pri segmentácii inštancií bolo separovanie jednotlivých buniek v jednom obrázku. Segmentácia inštancií stavia na predtým vytvorených maskách sémantickej

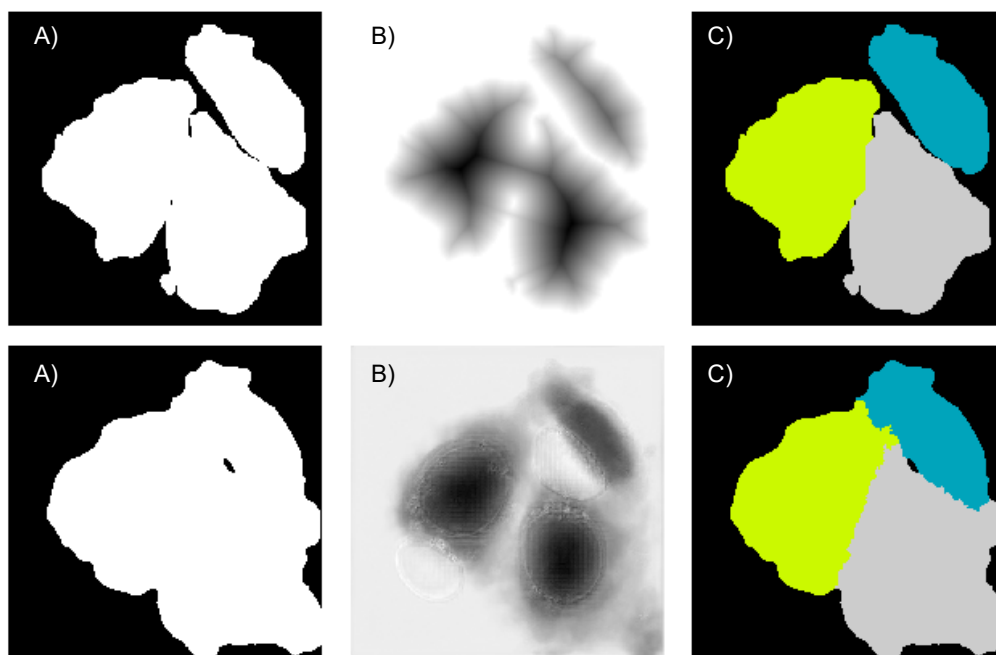


Obr. 5.2: Príklady A) PC-3 buniek a B) 22Rv1 buniek, kvantitatívne fázové snímanie, max projekcia, ich odpovedajúce binárne masky tvorené manuálnou segmentáciou v porovnaní s binárnymi maskami generovanými modelom s najlepším výkonom, preučená U-Net sieť a rez s najväčšou entropiou ako vstupy.

segmentácie a z nich vytvorené dištančnou transformáciou dištančné mapy. Vytvorené dištančné mapy slúžili ich modelu na trénovanie automatických/predikovaných dištančných máp ako ich referenčné hodnoty. Pre trénovanie bol vybratý vstup s najlepšou presnosťou sémantickej segmentácie, teda predučný U-Net s predpracovanými vstupmi cez entropiu projekciu. Cez natrénovaný model boli predikované automatické dištančné mapy.

Funkcia Watershed 3.5 bola pri segmentácii inšancií použitá dvakrát, prvýkrát do nej vstupovali ako vstupné obrázky automatické dištančné mapy a automatické segmentované masky buniek. Druhýkrát to bolo dištančné mapy, vzniknuté z manuálnych segmentačných masiek buniek, spolu s manuálnymi maskami buniek. Výsledkami funkcie Watershed boli obrázky separovaných jednotlivých buniek. Ako referenčné obrázky evaluácie slúžili separované jednotlivé obrázky buniek, ktoré vyšli z funkcie Watershed so vstupmi manuálnych segmentačných masiek buniek a z nich vytvorené dištančné mapy 5.3. Schéma celého postupu na 4.2.

Na zistenie úspešnosti boli použité hodnotiace metriky SEG a AP 3.7, obe využívajúce Jaccard koeficient. Podľa SEG metriky bola naša úspešnosť separovať jednotlivé bunky 0,41., táto hodnota bola získaná ako Jaccard koeficient jednotlivu bunku v referenčnom obrázku a následne všetky samostatné hodnoty zo všetkých referenčných obrázkov datasetu boli spriemerované. AP metrika navyše ráta s falošne pozitívnymi prípadmi, preto sa javí ako viac prísnejšia. Konkrétne hodnoty úspešnosti pomocou AP metriky sa nachádzajú v tabuľke 5.4 a na grafe 5.4, na ktorom ďalej vidíme na y ose mieru úspešnosti segmentácie, x os reprezentuje prah Jaccard koeficientu ako mieru, že ako dobre sú zarovnané referenčné obrázky s automaticky segmentovanými maskami. Na grafe sa nachádza skoro pravidelne znižujúca sa krivka, ktorá v podstate indikuje, že počet segmentovaných masiek s určitou úspešnosťou klesá s rastúcou hodnotou prahu. Chyby mohli nastať rovnako ako pri sémantickej segmentácii kvôli nepresnosti manuálnych masiek, čo sa



Obr. 5.3: Porovnanie sémantickej a instance segmentácie na 22Rv1 bunkovej línii - A) spojené, bunky ako jeden objekt, B) Dištančná mapa, C) obrázok so separovanými jednotlivými bunkami. Horný riadok zobrazuje automatické masky, spodný referenčné obrázky, teda manuálne anotácie

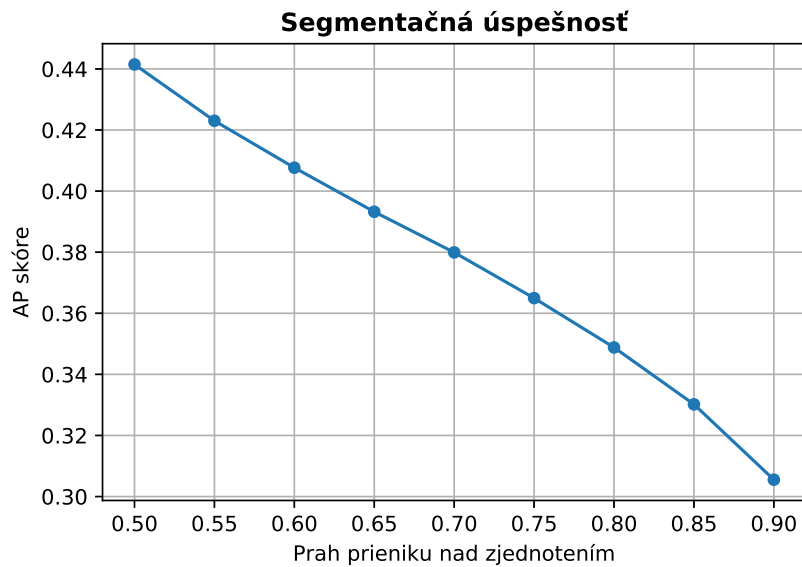
mohlo preniesť až k tvorbe masiek separovaných jednotlivých buniek. Kvôli viacerým rozdielom, ako napríklad, že veľkosť a tvar buniek sa niekedy dosť líšilo, bolo preto komplikované nastaviť parametre vo Watershede správne, čo potom spôsobovalo rôzne chyby v rozdeľovaní jednotlivých buniek.

Tab. 5.4: Priemerné hodnoty úspešnosti generovaných obrázkov so separovanými jednotlivými bunkami cez AP metriku v závislosti na lineárne sa zvyšujúcich hodnotách prahu.

Úspešnosť segmentácie	$t_{0,5}$	$t_{0,6}$	$t_{0,7}$	$t_{0,8}$	$t_{0,9}$
AP skóre	0,44	0,40	0,38	0,35	0,31

V práci [42] sa robila aj segmentácia inštancií pre bunky snímané kvantitatívnym fázovým snímaním (QPI) s rôznymi metodickými implementáciami. Opäť ich rozsah výsledkov pri QPI vyšiel od 0,09 až po 0,77 Dice koeficientu. V práci boli použité dve metódy Watershed riadené značením, prvým do funkcie vstupovali rovno binárne masky buniek, v druhom ich dištančné mapy. Výsledky vyšli 0,82 pre čisto binárne masky a 0,77 s použitím dištančných máp. Dôvodom ich zníženého výsledku použitím vylepšenej metódy cez dištančné mapy bol, že ich dataset buniek obsahoval

viac prirodzene separované bunky, teda menej prípadov buniek, ktoré sa prelínali. Výsledkom tejto práce bolo 0,41 Jaccard koeficient, ktorý bol neskôr, kvôli porovnávaniu, prerátaný na Dice koeficient. Hodnota Dice koeficientu úspešnosti Watershed funkcie tejto práce vyšiel 0,58. V ich rozsahu výsledkov bola vyrátaná priemerná úspešnosť 0,58, teda náš model bol niekde okolo priemeru. No v porovnaní s rovnakými použitými metódami Watershed bol náš model najslabší. Musí sa vziať v úvahu, že datasety oboch prác sa líšili, čiže na rovnakom datasete buniek by výsledky mohli byť iné.



Obr. 5.4: Graf segmentačnej úspešnosti generovaných masiek naším modelom v porovnaní s manuálnymi maskami v závislosti na lineárne sa zvyšujúcich hodnotách prahu.

Záver

Témou tejto semestrálnej práce bola segmentácia s využitím konvolučných neurónových sietí a hlbokého učenia. Hlavným krokom bola sémantická segmentácia, v ktorej boli predikované binárne masky buniek a ich sub-celulárnych regiónov (jadier a jadierok). Nadväzujúcim krokom bola segmentácia inštancií, v ktorej bolo riešený problém sémantickej segmentácie a to separovať jednotlivé bunky ako objekty v obraze.

Z dosiahnutých výsledkov pri sémantickej segmentácii sa môžu vyvodiť nasledujúce závery: (1) rôzne typy vstupných 2D obrázkov majú, iba minimálny efekt na finálnych výkonoch sietí, (2) kombinácia všetkých štyroch typov vstupov (mean, max, entropy a std projekcie) nevylepší výkon, naopak iba zväčšuje výpočtovú náročnosť a (3) použitím preučenej siete viditeľne zlepšili segmentačné schopnosti pri jadrách a jadierkach, a jemne zlepšili pri segmentácii buniek. Tieto dáta indikujú, že najlepším prístupom je použiť rez s najväčšou entropiou ako vstup pre predučení sieť U-Net. Spomenutým prístupom sa dosiahol Jaccard koeficient pre obe bunkové línie separátne. Z výsledkov je vidieť, že segmentácia PC-3 bunkovej línie prebehla úspešnejšie ako segmentácia 22Rv1 bunkovej línie, kde môžeme vidieť výrazný pokles pri segmentácii buniek a jadier, a najvýraznejší pri segmentácii jadierok. Toto spôsobuje fakt, že tieto bunečné línie sú úplne morfológicky od seba odlišné, bunky PC-3 majú kupolovitý tvar s nahromadenou bunečnou masou v strednej časti, pričom 22Rv1 bunky tvoria tesné spojenia s okolitými bunkami, čo robí tieto bunky ťažšie segmentovateľné.

Cieľom pri segmentácii inštancií bolo separovanie jednotlivých buniek v jednom obrázku. Podľa SEG metriky bola naša úspešnosť separovať jednotlivo bunky 0,41, táto hodnota bola získaná ako Jaccard koeficient jednotlivo pre každú bunku v referenčnom obrázku a následne všetky samostatné hodnoty zo všetkých referenčných obrázkov datasetu boli spriemerované. AP metrika navyše ráta s falošne pozitívnymi prípadmi. Vo výslednom grafe vidíme na y ose mieru úspešnosti segmentácie, x os reprezentuje prah Jaccard koeficientu ako mieru, že ako dobre sú zarovnané referenčné obrázky s automaticky segmentovanými maskami. Na grafe sa nachádza skoro pravidelne znižujúca sa krivka, ktorá v podstate indikuje, že počet segmentovaných masiek s určitými hodnotami úspešnosti klesá s rastúcou hodnotou prahu. V diskusií bola k tejto práci prirovnaná iná štúdia, ktorej výsledky dosahovali vyššie hodnoty, ale z dôvodu nie úplne rovnakej metodiky a použitia iných datasetov, sa nedá potvrdiť úplný vzťah medzi oboma výsledkami.

Literatúra

- [1] Ahmedin Jemal, Freddie Bray, Melissa M. Center, Jacques Ferlay, Elizabeth Ward, and David Forman. Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 61(2):69–90, 2011. URL: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.3322/caac.20107>, arXiv:<https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.3322/caac.20107>, doi:<https://doi.org/10.3322/caac.20107>.
- [2] A.V. Bono. The global state of prostate cancer: epidemiology and screening in the second millennium. *BJU International*, 94(s3):1–2, 2004. URL: <https://bjui-journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1464-410X.2004.05133.x>, arXiv:<https://bjui-journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1464-410X.2004.05133.x>, doi:<https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2004.05133.x>.
- [3] Jeffrey A Nickerson. Nuclear dreams: the malignant alteration of nuclear architecture. *Journal of cellular biochemistry*, 70(2):172–180, 1998.
- [4] Pond R Kelemen, Robert J Buschmann, and Paul Weisz-Carrington. Nucleolar prominence as a diagnostic variable in prostatic carcinoma. *Cancer*, 65(4):1017–1020, 1990.
- [5] B Helpap. Observations on the number, size and localization of nucleoli in hyperplastic and neoplastic prostatic disease. *Histopathology*, 13(2):203–211, 1988.
- [6] Jimin Lee, Hyejin Kim, Hyungjoo Cho, YoungJu Jo, Yujin Song, Daewoong Ahn, Kangwon Lee, YongKeun Park, and Sung-Joon Ye. Deep-learning-based label-free segmentation of cell nuclei in time-lapse refractive index tomograms. *bioRxiv*, 2018. URL: <https://www.biorxiv.org/content/early/2018/11/27/478925>, arXiv:<https://www.biorxiv.org/content/early/2018/11/27/478925.full.pdf>, doi:10.1101/478925.
- [7] Murali Varma, Min W Lee, Pheroze Tamboli, Richard J Zarbo, Rafael E Jimenez, Paulo GO Salles, and Mahul B Amin. Morphologic criteria for the diagnosis of prostatic adenocarcinoma in needle biopsy specimens: a study of 250 consecutive cases in a routine surgical pathology practice. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 126(5):554–561, 2002.
- [8] J. I. Epstein. Diagnostic criteria of limited adenocarcinoma of the prostate on needle biopsy. *Human Pathology*, 26(2):223–229, February 1995. doi:10.1016/0046-8177(95)90041-1.

- [9] Choon K. Yap, Emarene M. Kalaw, Malay Singh, Kian T. Chong, Danilo M. Giron, Chao-Hui Huang, Li Cheng, Yan N. Law, and Hwee Kuan Lee. Automated image based prominent nucleoli detection. *Journal of pathology informatics*, 6:39–39, Jun 2015. 26167383[pmid]. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26167383>, doi:10.4103/2153-3539.159232.
- [10] Advantages and Limitations of Fluorescence Microscopy, December 2020. URL: <https://www.azolifesciences.com/article/Advantages-and-Limitations-of-Fluorescence-Microscopy.aspx>.
- [11] P. Y. Liu, L. K. Chin, W. Ser, H. F. Chen, C.-M. Hsieh, C.-H. Lee, K.-B. Sung, T. C. Ayi, P. H. Yap, B. Liedberg, K. Wang, T. Bourouina, and Y. Leprince-Wang. Cell refractive index for cell biology and disease diagnosis: past, present and future. *Lab Chip*, 16:634–644, 2016. URL: <http://dx.doi.org/10.1039/C5LC01445J>, doi:10.1039/C5LC01445J.
- [12] Yongjin Sung, Wonshik Choi, Christopher Fang-Yen, Kamran Badizadegan, Ramachandra R. Dasari, and Michael S. Feld. Optical diffraction tomography for high resolution live cell imaging. *Opt. Express*, 17(1):266–277, Jan 2009. URL: <http://www.opticsexpress.org/abstract.cfm?URI=oe-17-1-266>, doi:10.1364/OE.17.000266.
- [13] Convolutional neural networks for visual recognition. URL: <https://cs231n.github.io/neural-networks-1/>.
- [14] Stanislav Trojan. *Lékařská fyziologie*. Grada Publishing as, 2003.
- [15] Jan J. *Medical image processing, reconstruction and restoration: concepts and methods*. Crc Press, 2005.
- [16] ImageNet. URL: <https://www.image-net.org/>.
- [17] Anupama Aggarwal. Transfer learning from pre-trained models. <https://towardsdatascience.com/transfer-learning-from-pre-trained-models-f2393f124751>, May 2013.
- [18] Prince Grover. 5 Regression Loss Functions All Machine Learners Should Know, April 2021. URL: shorturl.at/tuzEN.
- [19] Sanket Doshi. Various optimization algorithms for training neural network, Aug 2020. URL: <https://towardsdatascience.com/optimizers-for-training-neural-network-59450d71caf6>.

- [20] Sebastian Ruder. An overview of gradient descent optimization algorithms. *CoRR*, abs/1609.04747, 2016. URL: <http://arxiv.org/abs/1609.04747>, arXiv:1609.04747.
- [21] Diederik P Kingma and Jimmy Ba. Adam: A method for stochastic optimization. *arXiv preprint arXiv:1412.6980*, 2014.
- [22] Mayank Mishra. Convolutional Neural Networks, Explained, September 2020. URL: <https://towardsdatascience.com/convolutional-neural-networks-explained-9cc5188c4939>.
- [23] Alex Krizhevsky, Ilya Sutskever, and Geoffrey E Hinton. Imagenet classification with deep convolutional neural networks. *Communications of the ACM*, 60(6):84–90, 2017.
- [24] Krishna. Introduction to Exponential Linear Unit, May 2018. URL: <https://medium.com/@krishnakalyan3/introduction-to-exponential-linear-unit-d3e2904b366c>.
- [25] Keiron O’Shea and Ryan Nash. An introduction to convolutional neural networks. *CoRR*, abs/1511.08458, 2015. URL: <http://arxiv.org/abs/1511.08458>, arXiv:1511.08458.
- [26] Shuangfei Zhai, Hui Wu, Abhishek Kumar, Yu Cheng, Yongxi Lu, Zhongfei Zhang, and Rogerio Feris. S3pool: Pooling with stochastic spatial sampling. In *Proceedings of the IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition*, pages 4970–4978, 2017.
- [27] Xiao-Jiao Mao, Chunhua Shen, and Yu-Bin Yang. Image restoration using very deep convolutional encoder-decoder networks with symmetric skip connections. *arXiv preprint arXiv:1603.09056*, 2016.
- [28] Giorgio Roffo. *Ranking to Learn and Learning to Rank: On the Role of Ranking in Pattern Recognition Applications*. PhD thesis, 05 2017.
- [29] Aqeel Anwar. What is Transposed Convolutional Layer?, April 2021. URL: <https://towardsdatascience.com/what-is-transposed-convolutional-layer-40e5e6e31c11>.
- [30] Understanding region-based segmentation, November 1998. URL: <https://www.vision-systems.com/factory/consumer-packaged-goods/article/16739413/understanding-regionbased-segmentation>.

- [31] Salem Saleh Al-Amri, NV Kalyankar, and SD Khamitkar. Image segmentation by using edge detection. *International journal on computer science and engineering*, 2(3):804–807, 2010.
- [32] Farhana Sultana, Abu Sufian, and Paramartha Dutta. Evolution of image segmentation using deep convolutional neural network: A survey. *Knowledge-Based Systems*, 201-202:106062, 2020. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0950705120303464>, doi:<https://doi.org/10.1016/j.knosys.2020.106062>.
- [33] Alexander Kirillov, Kaiming He, Ross Girshick, Carsten Rother, and Piotr Dollár. Panoptic segmentation. In *Proceedings of the IEEE conference on computer vision and pattern recognition*, pages 9404–9413, 2019.
- [34] Olaf Ronneberger, Philipp Fischer, and Thomas Brox. U-net: Convolutional networks for biomedical image segmentation. In *International Conference on Medical image computing and computer-assisted intervention*, pages 234–241. Springer, 2015.
- [35] Kaiming He, Georgia Gkioxari, Piotr Dollár, and Ross B. Girshick. Mask R-CNN. *CoRR*, abs/1703.06870, 2017. URL: <http://arxiv.org/abs/1703.06870>, arXiv:1703.06870.
- [36] Uwe Schmidt, Martin Weigert, Coleman Broaddus, and Gene Myers. Cell detection with star-convex polygons. *Lecture Notes in Computer Science*, page 265–273, 2018. URL: http://dx.doi.org/10.1007/978-3-030-00934-2_30, doi:10.1007/978-3-030-00934-2_30.
- [37] Martin Weigert, Uwe Schmidt, Robert Haase, Ko Sugawara, and Gene Myers. Star-convex polyhedra for 3d object detection and segmentation in microscopy. In *The IEEE Winter Conference on Applications of Computer Vision*, pages 3666–3673, 2020.
- [38] A. Walker R. Fisher, S. Perkins and E. Wolfart. Distance transform. <https://homepages.inf.ed.ac.uk/rbf/HIPR2/distance.htm>.
- [39] K. Haris, S.N. Efstratiadis, N. Maglaveras, and A.K. Katsaggelos. Hybrid image segmentation using watersheds and fast region merging. *IEEE Transactions on Image Processing*, 7(12):1684–1699, 1998. doi:10.1109/83.730380.
- [40] Monika Kratochvilova, Martina Raudenska, Zbynek Heger, Lukas Richtera, Natalia Cernei, Vojtech Adam, Petr Babula, Marie Novakova, Michal Masarik, and Jaromir Gumulec. Amino acid profiling of zinc resistant prostate cancer cell

- lines: Associations with cancer progression. *The Prostate*, 77(6):604–616, 2017. doi:10.1002/pros.23304.
- [41] Live cell imaging microscope: 3d cell explorer, Dec 2020. URL: <https://www.nanolive.ch/products/3d-microscopes/cx/>.
- [42] Tomas Vicar, Jan Balvan, Josef Jaros, Florian Jug, Radim Kolar, Michal Masarik, and Jaromir Gumulec. Cell segmentation methods for label-free contrast microscopy: review and comprehensive comparison. *BMC Bioinformatics*, 20(1):360, December 2019. URL: <https://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12859-019-2880-8>, doi:10.1186/s12859-019-2880-8.
- [43] Yang Song, Weidong Cai, David Dagan Feng, and Mei Chen. Cell nuclei segmentation in fluorescence microscopy images using inter- and intra-region discriminative information. In *2013 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC)*, pages 6087–6090, 2013. doi:10.1109/EMBC.2013.6610941.

A Obsah priložených súborov

Spacek_BP	koreňový adresár priloženého súboru
├ codes	všetky kódy použité pri tejto práci
│ └ ap_gb_th.py	metrika AP s prahom
│ └ blurSharpAugmenter.py	skript impl. ostrenie/rozostrenie
│ └ dataloader_binary.py	načítanie dát - binárne masky
│ └ dataloader_dist.py	načítanie dát - dištančné mapy
│ └ dice_loss.py	dice loss
│ └ matrixDeformer.py	skript s augmentačnými metódami
│ └ seg_glob.py	metrika SEG
│ └ test_bi.py	predikovanie binárnych masiek
│ └ test_dist.py	predikovanie dištančných máp
│ └ train_cross_val.py	skript na tréovanie
│ └ watershed_glob.py	Watershed metóda
└ trial_instance_segmentation	priečinok so skúšobnými skriptami
│ └ cells	skúšobné obrázky
│ │ └ 652_bi_gt.npy	referenčná binárna maska
│ │ └ 652_bi_pr.npy	predikovaná binárna maska
│ │ └ 652_dist_gt.npy	referenčná dištančná mapa
│ │ └ 652_dist_pr.npy	predikovaná dištančná mapa
│ │ └ 652_separated_gt.npy	referenčná maska separovaných buniek
│ │ └ 652_separated_pr.npy	predikovaná maska separovaných buniek
│ └ ap.py	metrika AP
│ └ seg.py	metrika SEG
│ └ watershed.py	watershed metóda
│ └ README.txt	návod na spustenie